ZUR ATP-, ADP- UND AMP-BESTIMMUNG MIT DEM BIOLUMINESZENZVERFAHREN IM SPERMA EINIGER HAUSTIERE UND DES MENSCHEN

Wolfgang Kähn

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0018

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

ZUR ATP-, ADP- UND AMP-BESTIMMUNG MIT DEM BIOLUMINESZENZVERFAHREN IM SPERMA EINIGER HAUSTIERE UND DES MENSCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Wolfgang Kähn
aus
München

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent: Prof. Dr. W. Leidl
Korreferent: Prof. Dr. E. Scharrer

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	3
2.1.	Die Adenosinnucleotide	3
2.1.1.	Die Biochemie der Adenosinnucleotide und ihre Bedeutung im Stoffwechsel	3
2.1.2.	Die Wirkung der Adenosinnucleotide bei der Spermienbewegung	5
2.1.3.	Die Synthese von ATP durch Spermien	6
2.1.3.1.	Glykolyse	7
2.1.3.2.	Respiration	10
2.1.4.	Energiebilanz des Spermienstoffwechsels	13
2.1.5.	ATP-, ADP- und AMP-Gehalt in Spermien	15
2.1.6.	Faktoren, die sich auf den Adenosinnucleotidgehalt im Sperma auswirken können	20
2.1.7.	ATP-, ADP- und AMP-spaltende Enzyme im Sperma	22
2.1.8.	Adenylate energy charge	24
2.2.	Die Biolumineszenz	27

2.2.1.	Geschichte der Biolumineszenz	27
2.2.2.	Das Wesen der Biolumineszenz	29
2.2.3.	Reaktionsbedingungen	33
2.2.3.1.	Meßoptimum	33
2.2.3.2.	Hemmende Faktoren	34
2.2.4.	Meßgerät	36
2.2.5.	Die Kinetik einer ATP-Messung	37
2.2.5.1.	Mit Reinsubstanzen	37
2.2.5.2.	Mit Sperma	38
2.2.6.	Enzymatische Umwandlung von ADP und AMP in ATP	41
2.2.7.	Die Biolumineszenzmessung von ADP und AMP	44
2.3.	Probenpräparation	47
2.3.1.	Zellaufschluß	48
2.3.2.	Nucleotidasendenaturierung	49
2.4.	Die Tiefgefrierung von Spermien	50
2.4.1.	Die Auswirkung unterschiedlicher Glyzerinkonzentrationen auf Spermien	50
3.	Eigene Untersuchungen	53
3.1.	Material	53
3.1.1.	Spermaspender	53

3.1.2.	Spermagewinnung	53
3.1.3.	Die Voruntersuchung der Ejakulate	54
3.2.	Methodik und ihre Erarbeitung	56
3.2.1.	Messung und Errechnung einer ATP-Menge	56
3.2.1.1.	Meßprinzip	56
3.2.1.2.	Meßgerät	56
3.2.1.3.	Meßreagenzien	57
3.2.1.4.	Meßvorgang	62
3.2.1.5.	Errechnung des ATP-Gehaltes einer Probe	64
3.2.1.5.1.	Getrennte Vergleichsmessung	64
3.2.1.5.1.	Interne Standardisierung	65
3.2.2.	Die Präparation einer Spermaprobe für die Biolumineszenzmessung	68
3.2.2.1.	Das Erhitzen von Sperma	68
3.2.2.1.1.	Einfluß des Probenvolumens	70
3.2.2.1.2.	Einfluß der Erhitzungsdauer	72
3.2.2.1.3.	Auswirkungen unterschiedlicher Reagenzgläser	75
3.2.2.1.4.	Die Höhe der Temperatur	75
3.2.2.1.5.	Standardisierung des Erhitzungsvorganges	75

3.2.2.1.6.	Reproduzierbarkeit der Meßwerte von erhitztem Sperma	76
3.2.2.2.	Die Nucleotidextraktion aus Zellen durch NRS	78
3.2.2.2.1.	Lumineszenzerhöhung durch steigende NRS-Konzentrationen	78
3.2.2.2.2.	Die Kinetik einer ATP-Messung in nativem Sperma mit NRS	83
3.2.2.2.3.	Verhältnis NRS : Zellzahl	87
3.2.2.2.4.	Reproduzierbarkeit der mit NRS gemessenen Werte	89
3.2.3.	Die Messung von ADP	89
3.2.3.1.	Umwandlung von ADP in ATP	89
3.2.3.2.	Ansatz zur ADP-Messung	91
3.2.3.3.	Die Bestimmung von ADP in nativem Sperma	92
3.2.3.4.	Die Bestimmung von ADP in erhitztem Sperma	99
3.2.4.	Die Messung von AMP	99
3.2.4.1.	Umwandlung von AMP in ATP	99
3.2.4.2.	Ansatz zur AMP-Messung	101
3.2.4.3.	Die Bestimmung von AMP in erhitztem Sperma	102

3.3.	Die Anwendung der Adenosinnucleotidbestimmung mit der Bioluminiszenz bei spermatologischen Fragestellungen	112
3.3.1.	Methodisches Vorgehen	112
3.3.1.1.	Die Trennung von Spermien und Plasma	112
3.3.1.2.	Die Erstellung von Verdünnermedien	113
3.3.1.3.	Das Verdünnen und Tiefgefrieren der Bullenspermien	116
3.3.2.	Ergebnisse	117
3.3.2.1.	Herkunft der ATPasen im Sperma von Bullen	117
3.3.2.2.	Vergleich zwischen der Reaktionskinetik von erhitztem und nativem Sperma einiger Spezies	121
3.3.2.3.	Der durchschnittliche ATP-, ADP- und AMP-Gehalt im Sperma verschiedener Spezies	125
3.3.2.4.	ATP- und Motilitätsabfall während des Tiefgefriervorganges bei fraktionierter und unfraktionierter Glyzerinzugabe	127

3.3.2.5.	Der ATP- und ADP-Gehalt von Bullenspermien, die auf unterschiedliche Glyzerinendkonzentrationen verdünnt worden waren, bei +20°C, bei +5°C, und nach dem Auftauen	132
4.	Diskussion	138
5.	Zusammenfassung	157
6.	Summary	159
7.	Literaturverzeichnis	161
	Lebenslauf	176

1. Einleitung

Die Adenosinnucleotide ATP, ADP und AMP nehmen im intermediären Stoffwechsel eine Schlüsselposition ein. Sie sind in zahllosen Organismen das Sammelbecken für chemische Energie. KARLSON (1974) nennt das Adenosintriphosphat den "Motor" vieler Lebensvorgänge und das "energetische Zahlungsmittel" des Organismus.

Auch für Spermien besitzen sie diese zentrale Bedeutung. Die Samenzellen schöpfen aus den Adenosinnucleotiden die Kraft zur Bewegung und zum Überleben (MANN, 1964). Ihr Vorkommen hat entscheidende Konsequenzen für jedes einzelne Spermium.

Als wichtiger Metabolit des Spermienstoffwechsels erscheinen sie deshalb für eine Qualitätsbeurteilung von Sperma außerordentlich interessant.

Die Entdeckung, diese energetisch hochwertigen Phosphorverbindungen mittels einer enzymchemischen Methode, der "Biolumineszenz", zu messen, gab der klinischen Chemie ein wertvolles Nachweisverfahren an die Hand. Es ist anderen, in der ATP-Analytik eingesetzten Verfahren an Genauigkeit und Schnelligkeit überlegen (STANLEY und WILLIAMS, 1968).

Ziel vorliegender Arbeit war es, die Methodik der ATP-Bestimmung mit dem Biolumineszenzverfahren sowohl auf die Messung von ADP,als auch AMP auszuweiten. Bei den Vorversuchen zum Nachweis von ADP und AMP in den Spermien mit der Luciferin-Luciferase-Reaktion wurde die Notwendigkeit zur Vorbehandlung der zu untersuchenden Proben erkennbar. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit der Einfluß der Denaturierung des Spermas durch Hitze und die Wirkung eines Detergens auf die Adenosinnucleotidbestimmung untersucht.

Nach einer Klärung methodischer Probleme der Bestimmung von ATP, ADP und AMP mit dem Biolumineszenzverfahren wurde überprüft, ob das Miteinbeziehen dieser Parameter bei Fragestellungen der Spermakonservierung,im Vergleich zum ATP-Nachweis allein,zusätzliche Informationen erbringt.

Weiter wurde die Herkunft der die Nucleotide spaltenden Enzyme im Sperma untersucht ,und die durchschnittlichen ATP-, ADP- und AMP-Gehalte in Ejakulaten der Haustiere und des Menschen ermittelt.

2. Literatur

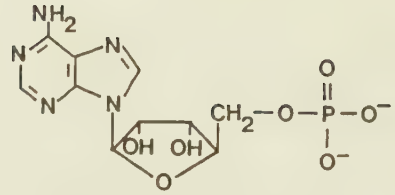
2.1. Die Adenosinnucleotide

2.1.1. Die Biochemie der Adenosinnucleotide und ihre Bedeutung im Stoffwechsel

Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) sind Nucleosidphosphate und gehören zur Gruppe der Coenzyme.

Sie sind aufgebaut aus der Purinbase Adenin und dem Monosaccharid Ribose, wobei eine Phosphorsäure am OH der Ribose in 5-Stellung verestert ist. Ist eine Phosphorsäure mit dem Adenosin verknüpft, wird diese Verbindung Adenylsäure oder AMP genannt, bei zwei Phosphorsäuren spricht man von ADP, und mit drei Phosphorsäuren gelangt man zum ATP. Die Phosphorsäuren verbinden sich untereinander anhydridartig (Abb. 1).

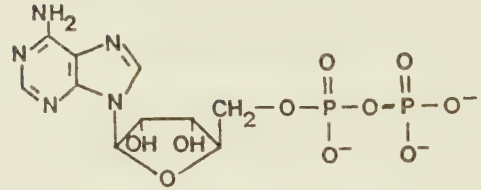
Die Nucleotide besitzen ihre große Bedeutung als Bindeglied zwischen energieliefernden und -verzehrenden Reaktionen. Sie sind Coenzyme, die in allen Zellen zu finden sind. Dort dienen sie als direkte, leicht verfügbare Energiequelle. Die beim Abbau von Nahrungs-



Adenin Ribose Phosphorsäure

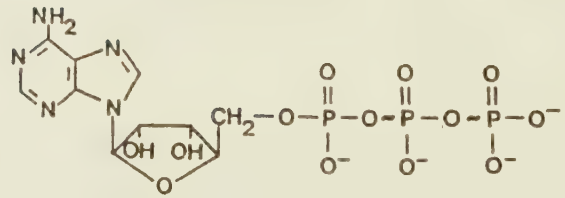
Adenosin

Adenosinmonophosphat (AMP)



Ade — Rib — P ~ P

Adenosindiphosphat (ADP)



Ade — Rib — P ~ P ~ P

Adenosintriphosphat (ATP)

Abb.1: Die Konfiguration der Adenosinnucleotide

(Karlson, 1974)

stoffen freiwerdende Energie wird durch die Rephosphorylierung von AMP und ADP zu ATP als chemische Energie gespeichert. Aus dem Triphosphat können Phosphatgruppen übertragen und abgespalten werden; dadurch werden endotherme Prozesse ermöglicht. Die Resynthese von ATP erfolgt meist durch Glykolyse oder Respiration (BUDDECKE, 1974).

Die Nucleotide sind im intermediären Stoffwechsel ein Sammelbecken für Phosphatreste und können als energetisch hochwertige Verbindungen für biologische Leistungen, wie die Muskelkontraktion oder die Spermienbewegung, verwendet werden (KARLSON, 1974).

2.1.2. Die Wirkung der Adenosinnucleotide bei der Spermienbewegung

Eine kontraktile Substanz, lokalisiert im Axialfilament des Spermienmittelstückes, bewirkt das Schwanzschlagen, und damit die aktive Beweglichkeit eines Spermiums (SALISBURY und VANDEMARK, 1961; MANN, 1964). Dieses kontraktile Element - in seiner chemischen Zusammensetzung noch nicht identifiziert - ähnelt dem Myosin des Muskels (BURNASHEVA, 1958).

Die "Spermosin" bezeichnete Substanz bildet, aktiviert von ATP, einen dem Aktomyosin vergleichbaren Komplex und führt so zu einer Kontraktion. Durch ATP-Spaltung kommt es zwischen Aktin- und Myosinfilamenten zu einer Brückenbildung, durch die sich beide Proteine teleskopartig ineinander schieben und dabei die Fibrillen verkürzen. Die Energie, die zur Bildung des Aktomyosinkomplexes notwendig ist, wird durch einen Abbau des ATPs zu ADP und AMP gewonnen (BUDDECKE, 1974; KARLSON, 1974). Diese Dephosphorylierung wird von ATPasen katalysiert:

$$ATP \xrightarrow{\text{Phosphatase}} ADP + HPO_3 + \text{Energie}$$

$$ADP \xrightarrow{\text{Phosphatase}} AMP + HPO_3 + \text{Energie}$$

(SALISBURY und VANDEMARK, 1961)

2.1.3. Die Synthese von ATP durch Spermien

Eine Erschöpfung des ATP-pools führt zu einem Sistieren der Spermienmotilität. Deshalb muß zur Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen ATP-Angebotes eine ständige Resyntheseleistung erbracht werden (SALIS-

BURY und VANDEMARK, 1961).

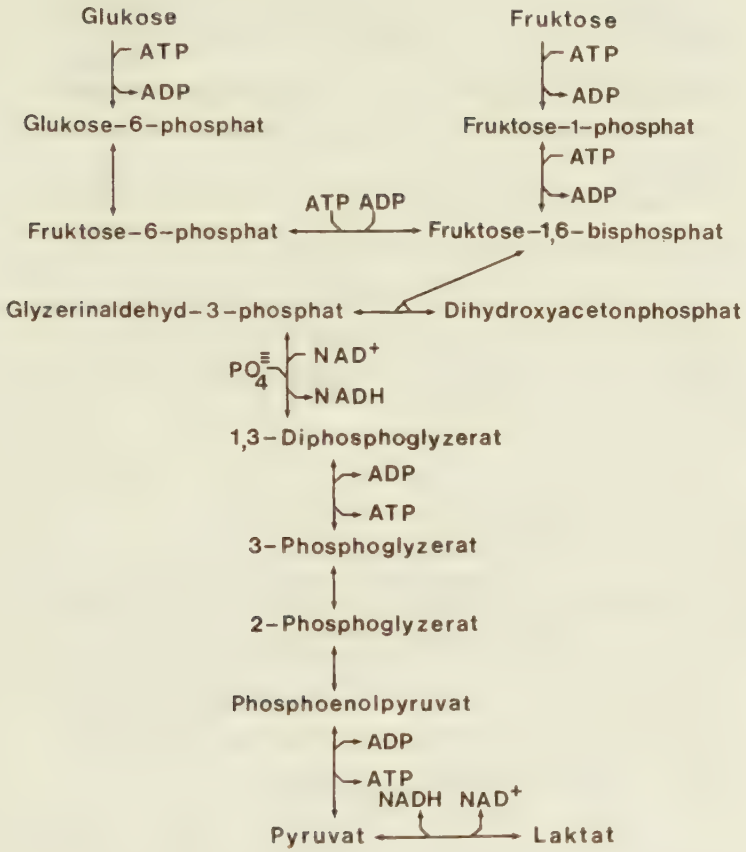
Laufen energieliefernde Prozesse ab, werden von organischen und anorganischen Phosphatträgern Phosphatgruppen auf AMP bzw. ADP zur Rückverwandlung in ATP übertragen. Im Spermienstoffwechsel wird die dazu erforderliche Energie in Abwesenheit von Sauerstoff durch die Glykolyse gewonnen; ist Sauerstoff verfügbar sowohl durch Glykolyse, als auch durch endogene und exogene Respiration (SALISBURY und VANDEMARK, 1961). Der Ort der ATP-Synthese ist das Mittelstück des Spermienschwanzes, von wo es in den Endabschnitt diffundiert und bei ATP-Überschuß auch gespeichert werden kann (NEVO und RIKMENSPOEL, 1969).

2.1.3.1. Glykolyse

Unter anaeroben Bedingungen ist die Glykolyse für Spermien die Hauptquelle der Energiegewinnung. Im Sperma handelt es sich bei dem energieliefernden Substrat um den Zucker Fruktose, weshalb hier von Fruktolyse gesprochen wird (MANN, 1964; SALISBURY und VANDEMARK, 1961).

Zu Beginn der Glykolyse wird die endständige Phosphatgruppe eines ATP durch das Enzym Hexokinase auf eine Hexose übertragen (Abb. 2).

Die Hexose des Spermienstoffwechsels ist Fruktose, die in Fruktose-6-phosphat und weiter unter ATP-Verbrauch durch die Phosphofruktokinase zu Fruktose-1,6-bisphosphat phosphoryliert. Das Fruktose-1,6-bisphosphat wird durch eine Aldolase in Dihydroxyacetonphosphat und Glyzerinaldehyd-3-phosphat gespalten. Wird Glyzerinaldehyd-3-phosphat durch die folgende Reaktion verbraucht, kann es durch die Triosephosphat-Isomerase jederzeit aus Dihydroxyacetonphosphat nachgebildet werden. Das G-3-P reagiert mit der Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase, wird dehydriert und unter Anlagerung von anorganischem Phosphat in Glyzerinsäure-1,3-bisphosphat verwandelt. Durch diese Dehydration wird NAD zu NADH reduziert. Das Enzym Phosphoglyzeratkinase überträgt anschließend ein Phosphat vom Glyzerinsäurebisphosphat auf ADP. Es entsteht ATP und 3-Phosphoglyzerinsäure. 3-Phosphoglyzerat wird durch Phosphatverschiebung in 2-Phosphoglyzerat umgelagert, dabei spaltet eine Enolase Wasser ab. Die entstandene Verbindung ist das Phosphoenolpyruvat, von dem durch die Pyruvatkinase Phosphat auf ADP



(nach Salisbury & VanDemark,1961)

Abb. 2: Die einzelnen Schritte der Glykolyse

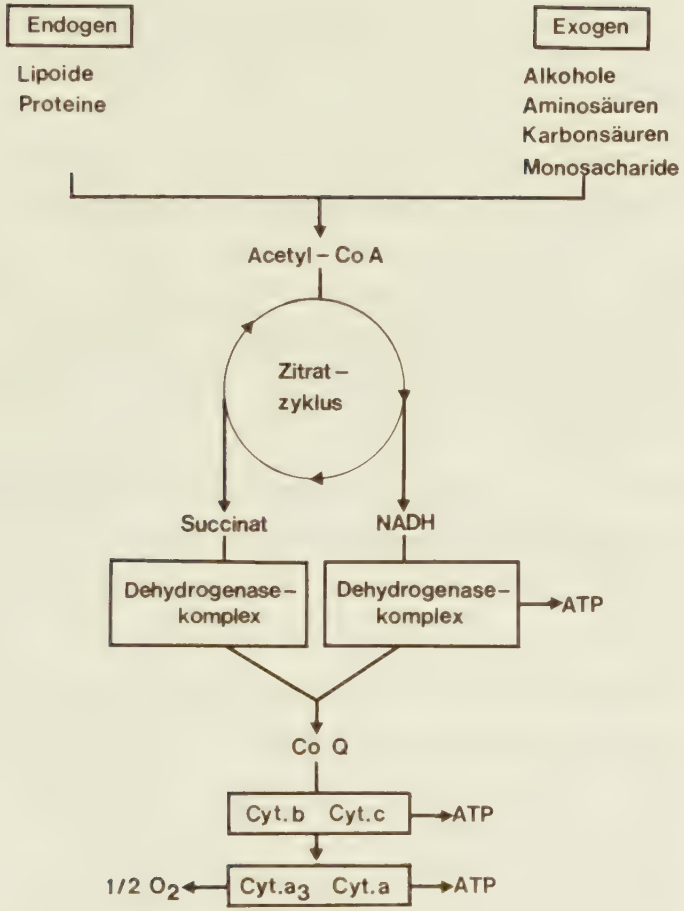
übertragen wird und Pyruvat entsteht (KARLSON, 1974; BUDDECKE, 1974). Unter anaeroben Bedingungen wird nun unter Vermittlung der Laktatdehydrogenase Pyruvat zu Laktat reduziert und NADH oxidiert.

Zieht man eine Energiebilanz, so erbringt der Abbau von einem Mol Fruktose zwei Mol ATP. Es bleibt die energiereiche Milchsäure, die, falls Sauerstoff verfügbar ist, weiter nutzbar gemacht werden kann (MANN, 1964; SALISBURY und VANDEMARK, 1961).

2.1.3.2. Respiration

In Anwesenheit von Sauerstoff wird die bei der Fruktolyse anfallende Milchsäure oxidiert, über Pyruvat Acetylcoenzym A gebildet, das mit Oxalazetat zum Zitrat kondensieren kann. Damit mündet die Fruktolyse in den Zitronensäurezyklus (Abb. 3).

Im Zitratzyklus, der nur in Verbindung mit der Atmungskette abläuft, wird CO_2, NADH und FADH gebildet. Die Substrate NADH und FADH, die im Redoxsystem der Atmungskette dehydriert werden, erbringen dabei eine hohe Energieausbeute. Diese wird zu einem großen



Co Q = Coenzym Q (Ubichinon)
Cyt. = Cytochrom

(nach PETERSON und FREUND, 1970)

Abb. 3: Die Respiration der Spermien

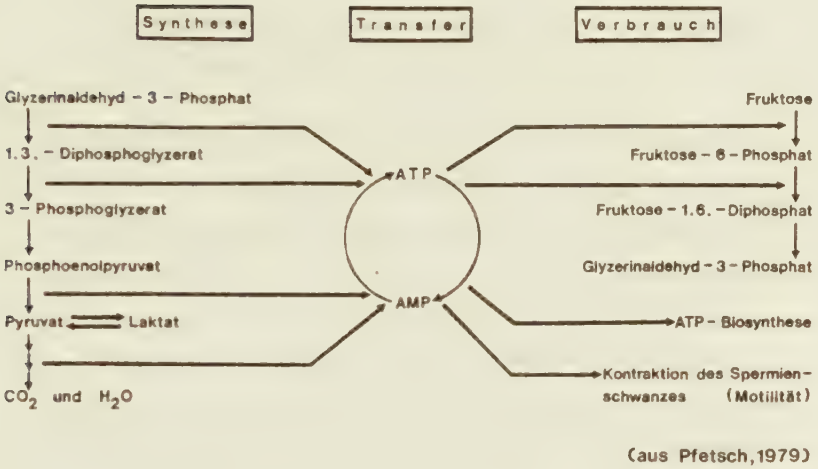
Teil während der Atmungskettenphosphorylierung in Form von ATP abgefangen (SALISBURY und VANDEMARK, 1961; MANN, 1964; BUDDECKE, 1974; KARLSON, 1974).

Außer den bei der Fruktolyse anfallenden Substraten Laktat und Pyruvat, können von Spermien noch weitere Stoffe durch die Respiration verwertet werden. Stammen diese Substanzen aus der Spermienumgebung, spricht man von exogener Respiration, werden diese dagegen aus Spermienbestandteilen bezogen, von endogener Respiration (MANN, 1964).

Intracellulär gespeicherte Phospholipide werden als Hauptenergiequelle der endogenen Respiration betrachtet (LARDY und HANSEN, 1941 a und b; LARDY et al., 1945).

Als Substrate für die exogene Respiration dienen Glukose, Fruktose, Mannose, Glyzerol, Sorbitol, Succinat, Fumarat, Malat, Zitrat, Milch-, Brenztrauben- und Essigsäure, Fettsäuren und viele Aminosäuren SALISBURY und VANDEMARK, 1961; MANN, 1964).

2.1.4. Energiebilanz des Spermienstoffwechsels



(aus Pfetsch, 1979)

Abb. 4: ATP im Spermienstoffwechsel

Zur Energiegewinnung stehen den Spermien verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung (Abb. 4). Ein Regelmechanismus befähigt sie, sich wahlweise der Glykolyse, der endogenen oder exogenen Respiration zu be-

dienen. Dieses "Pasteur Effekt" genannte Phänomen unterdrückt in Anwesenheit von Sauerstoff die anaerobe Glykolyse und hilft damit Substrat sparen. Andererseits kann bei Sauerstoff- oder Fruktosemangel vermehrt die anaerobe Glykolyse oder die endogene Respiration herangezogen werden (MANN, 1964).

Vergleicht man den Energiegewinn der verschiedenen Wege des Spermienstoffwechsels, so ergibt sich für die aerobe Glykolyse das günstigste Energie-Substratverhältnis. Sie ist der für Spermien energetisch wertvollste und gleichzeitig im Fruktoseverbrauch sparsamste Abbauprozeß. Dies zeigt die folgende Kalkulation, bei der in Punkt 1. der Energiegewinn durch die anaerobe Glykolyse und unter 2. die ATP-Ausbeute aus der aeroben Glykolyse errechnet ist:

1. Anaerobe Glykolyse:

   1 Mol Fruktose → 2 Mol Pyruvat, = 2 Mol ATP

2. Aerobe Glykolyse:

   1 Mol Fruktose → 2 Mol Pyruvat, = 2 Mol ATP

   2 Mol Pyruvat → H_2O + CO_2 = 30 Mol ATP

   2 Mol G-3-P → Phospholglyzerat= 6 Mol ATP*

   38 Mol ATP

(WHITE, HANDLER, SMITH und STETTEN, 1954)

*(Hier besteht der Energiegewinn im Elektronentransfer durch die NAD/$NADH^+$ Oxidation).

Der Abbau der Fruktose durch die Respiration ist also 19mal effektiver als durch anaerobe Glykolyse (SALISBURY und VANDEMARK, 1961).

2.1.5.ATP-, ADP- und AMP-Gehalt in Sperma

Als erste entdeckten LARDY und PHILLIPS (1941 b) und MANN (1945a,b,c) das Vorkommen von ATP in Sperma. Sie konnten im Ejakulat von Schafböcken pro 100 Millionen Spermien einen ATP-Gehalt von 22 nmol ermitteln. Seither wurde von vielen Autoren mit unterschiedlichen Meß- und Extraktionsverfahren ATP im Sperma verschiedener Spezies gemessen. Das meiste ATP wurde in Spermien von Wiederkäuern gefunden. Am wenigsten ließ sich in Hahnejakulaten nachweisen (Tab.: 1).

NEWTON und ROTHSCHILD (1961) konnten erstmals alle drei Adenosinnucleotide im Bullensperma messen. Sie ermittelten 12,9 x 10^{-9} mol ATP/10^8 Spermien, 12,0 x 10^{-9} mol ADP/10^8 Spermien und 13,5 x 10^{-9} mol AMP/10^8Spermien. Es wurden von den meisten Autoren weniger ADP und AMP als ATP in den Ejakulaten verschiedener Tierarten gefunden (Tab.: 2 und 3). Das angegebene Verhältnis von ATP zu ADP zu AMP schwankte

von etwa 1:1:1 (NEWTON und ROTHSCHILD, 1961) bis 7:2:1 (BROOKS,1970a,b; 1971) im Sperma von Bullen.

Trotz unterschiedlicher Meß- und Extraktionsmethoden lagen die Angaben aller Autoren für die verschiedenen Spezies in der Größenordnung von 10^{-9} mol.

Tab.: 1

ATP-Gehalt in Spermien

Spezies	Nachweisverfahren	ATP in 10^{-9} Mol pro 10^{8} Spermien	Autoren
Mann	I,a	10,84	BRACKETT u. WILLIAMS, 1967
	I	12,65	PETERSON u. FREUND, 1970
	II,b	12,89	VILAR et al., 1980
Bulle	III	12,9	NEWTON u. ROTHSCHILD, 1961
	I,a	8,68 [1]	BRACKETT u.WILLIAMS, 1967
	I,c	14,5	BROOKS, 1971
	I	10,5 [1]	HOSKINS, 1972
	I,d	5,52*	PRINZEN, 1977
	I,d	76,5	FOULKES u. MACDONALD, 1979
	I	5,0 [2]	PFETSCH, 1979
	I	7,6 [3]	PFETSCH, 1979
Hengst	I,a	10,84 [1]	BRACKETT u.WILLIAMS, 1967
	I,c	17,6	BROOKS, 1971
	I	1,5 [2]	PFETSCH, 1979
	I	3,9 [3]	PFETSCH, 1979

Eber	I,a	19,32	1	BRACKETT u. WILLIAMS, 1967
	I,c	5,1		BROOKS, 1971
	I	6,0	2	PFETSCH, 1979
	I	8,6	3	PFETSCH, 1979
Schaf-		22,0		MANN, 1945a
bock		22,47		VOGLMAYR et al., 1966
	I,c	29,1		BROOKS, 1971
	I	6,1	2	PFETSCH, 1979
	I	13,1	3	PFETSCH, 1979
Ziegen-	I	9,5	2	PFETSCH, 1979
bock	I	21,4	3	PFETSCH, 1979
Kanin-	I,a	4,54		BRACKETT u.WILLIAMS, 1967
chen-	I	0,7	2	PFETSCH, 1979
bock	I	1,5	3	PFETSCH, 1979
Hamster	I,c	50,0		ROGERS u. MORTON, 1973
Hahn	I,a	0,99		BRACKETT u. WILLIAMS, 1967
Hund	I,a	2,56		BRACKETT u. WILLIAMS, 1967

Tab.: 2

ADP-Gehalt in Spermien

Spezies	Nachweisverfahren	ADP in 10^{-9} Mol pro 10^{8} Spermien	Autoren
Bulle	III	12,0	NEWTON u. ROTHSCHILD, 1961
	III,c	7,5	BROOKS, 1970a
	I,c	4,1	BROOKS, 1971
	I	5,2 [1]	HOSKINS, 1972
Hengst	III,c	4,3	BROOKS, 1970a
	I,c	2,9	BROOKS, 1971
Eber	III,c	5,0	BROOKS, 1970a
	I,c	4,4	BROOKS, 1971
Schafbock		25,04	VOGLMAYR et al., 1966
	III,c	15,4	BROOKS, 1970a
	I,c	23,2	BROOKS, 1971

Tab: 3

AMP-Gehalt in Spermien

Spezies	Nachweisverfahren	AMP in 10^{-9} Mol pro 10^{8} Spermien	Autoren
Bulle	III,	15,5	NEWTON u. ROTHSCHILD, 1961
	III,c	2,0	BROOKS, 1970a
Hengst	III,c	21,7	BROOKS, 1970a
Eber	III,c	1,2	BROOKS, 1970a
Schafbock	III,c	5,9	BROOKS, 1970a

Zeichenerklärung:

Meßmethode: I Biolumineszenz, II Enzymanalyse nach BÖCHER, III Chromatographie.

Extraktionsmethode: a) Hitzeextraktion
b) Perchlorsäureextraktion
c) Trichloressigsäureextraktion
d) Nucleotid releasing substance Extraktion

1 Nebenhodensperma, 2 Spermien mit Plasma,
3 gewaschene Spermien.

*ng/mm^3 Sperma

2.1.6. Faktoren, die sich auf den Adenosinnucleotidgehalt im Sperma auswirken können

Die für Frischejakulate ermittelten Adenosinnucleotidkonzentrationen können unter bestimmten Bedingungen starken Schwankungen unterliegen. Werden Spermien der sie umgebenden Fruktose beraubt, nimmt ATP rasch ab. Ein ähnlich starker Abfall kann bei Spermien beobachtet werden, die anaerob inkubiert sind. Er ist jedoch sofort rückgängig zu machen, wenn den Spermien glykolysierbare Stoffe angeboten werden. Eine Verminderung an ATP und ADP unter anaeroben Bedingungen ist von einem deutlichen AMP-Anstieg begleitet (MANN, 1945). Mit einem Mangel an Zucker und Sauerstoff begründet BROOKS (1970b) eine ATP-Verringerung mit gleichzeitiger ADP-Zunahme nach der Zentrifugation von Sperma. Er sieht die Trennung der Spermien von ihren Substraten als Ursache einer verminderten ATP-Synthese.

PETERSON und FREUND (1970) konnten durch Succinat in Humansperma eine Stimulierung der Respiration erreichen. Dadurch erhöhte sich die ATP-Syntheserate. Ein ähnlicher Effekt war jedoch für keine der übrigen Substanzen des Zitronensäurezyklus zu verzeichnen.

Den Einfluß einer 90 minütigen Spermalagerung auf den ATP-Gehalt untersuchte PRINZEN (1977). Er inkubierte bei 38°C und 22°C in Ringer-Fruktose-Phosphat-Puffer (RFPP) suspendierte Spermien und fand eine Verminderung des ATP-Gehaltes von 23,2 % bzw. 7,3 %.

Weiter wurde ATP von in CUE-Tris und mit RFPP verdünntem Sperma bestimmt. Nach 90 Minuten wurde im CUE-Tris-Verdünner ein ATP-Abfall um 23,2 % gegenüber 7,8 % in RFPP festgestellt.

Wird Nebenhodenspermien Koffein, Teophyllin oder zyklisches AMP zugesetzt, resultiert daraus eine drei- bis fünffache Erhöhung der Fruktolyse; im selben Maße verringert sich ATP. Dies ist nach Ansicht von HOSKINS (1972) durch die Eigenheiten des Kohlenhydratmetabolismus der Spermien und den enzyminhibitorischen Effekt von Koffein, Teophyllin und cAMP bedingt, ohne daß dafür nähere Angaben gemacht werden.

In Kapazitationsversuchen an Hamsterspermien fanden ROGERS und MORTON (1973) höhere ATP-Werte bei Zellen in Tyrodelösung als bei Kontrollen in humanem Serumalbumin. Die niedrigeren ATP-Werte wurden als Folge einer höheren Motilität und dadurch größerer ATP-Hydrolyse interpretiert.

Übereinstimmend berichten FOULKES und MACDONALD (1979) und PFETSCH (1979), daß in nativen Ejakulaten eine positive Korrelation zwischen der Motilität von Spermien und ihrem ATP-Gehalt besteht.

2.1.7. ATP-, ADP- und AMP-spaltende Enzyme im Sperma

Adenosinnucleotid-abbauende Enzyme kommen sowohl im Seminalplasma, als auch in den Spermien selbst vor.

In ersterem können drei verschiedene ATPasen nachgewiesen werden (HEPPEL und HILMOE, 1952). Sie katalysieren folgende Reaktionen:

Eine "Pyrophosphat (PP) bildende ATPase":

$$ATP + H_2O \longrightarrow PP + A\text{-}5'\text{-}P$$
$$ADP + H_2O \longrightarrow A\text{-}5'\text{-}P + \text{ortho } P$$

Eine "saure ATPase":

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + \text{ortho } P$$
$$ADP + H_2O \longrightarrow A\text{-}5'\text{-}P + \text{ortho } P$$

Eine "alkalische ATPase":

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + \text{ortho P}$$
$$ADP + H_2O \longrightarrow A\text{-}5'\text{-}P + \text{ortho P}$$

Im Samenplasma von Bullen finden sich 80 Einheiten/ml saure ATPase, 170 Einheiten/ml alkalische ATPase und 40 Einheiten/ml PP-bildende ATPase (MANN, 1964).

Die durch enzymatische Katalyse entstehenden Substrate A-5'-P und Pyrophosphat können durch eine Pyrophosphatase und durch 5-Nucleotidasen weiterverwandelt werden. Beide Enzyme sind reichlich im Seminalplasma vorhanden, z.B. bei Bullen 40 Einheiten/ml Pyrophosphatase und 2900 Einheiten/ml 5-Nucleotidase (MANN, 1945a).

Die Lokalisation von ATPasen im Spermium wird auf dem Schwanzmittelstück und in geringer Menge in seinem Endteil vermutet; der Kopf scheint davon frei zu sein (NELSON, 1954; MOHRI, 1964).

Die Bedeutung der Nucleotidasen liegt in ihrem Einfluß auf das Kontraktionsvermögen der Axialfilamente (BISHOP, 1962). Ein Teil ihrer Wirkung könnte in einer Beteiligung am Natrium-Kalium Transport bestehen (QUINN und WHITE, 1968).

Diesen Zusammenhang mit der Beweglichkeit der Spermien sehen auch ROUSSEL und STALLCUP (1966). Sie stellten eine positive Korrelation zwischen der Häufigkeit von saurer und alkalischer Phosphatase und dem Prozentsatz beweglicher Spermien fest. Durchschnittlich konnten sie 26 Einheiten saure ATPase und 7,4 Einheiten alkalische ATPase in Spermien von Bullen nachweisen.

SCHIRREN et al. (1979) fanden in Ejakulaten von Männern eine positive Korrelation zwischen der Dichte und der ATPasen-Aktivität im Sperma.

Die für das Samenplasma beschriebenen Phosphatasen finden sich auch im Spermium und werden von vielen Autoren auf dem Flagellum vermutet (MANN, 1949; ENGELHARDT und BURNASHEVA, 1957; MASAKI und HARTREE, 1962).

2.1.8. "Adenylate energy charge"

Adeninnucleotide findet man in allen stoffwechselaktiven Zellen. Sie sind für die Kopplung von energieliefernden und -verbrauchenden Prozessen verantwort-

lich. Ihrem zahlreichen Auftreten in lebenden Zellen steht ihr rascher Abbau, bzw. ihre fehlende Resynthese in toten oder sterbenden Organismen gegenüber. Die Häufigkeit ihres Vorkommens und die Relation zueinander macht sie zu einem Gradmesser für die Lebensäußerungen von Zellsystemen. Das Adenylatsystem als "Energieumschlagplatz" besteht aus einem ATP-, ADP-, AMP-pool (CHAPMAN und ATKINSON, 1977).

Die darin enthaltene Energie und ihr Verteilungsmuster kann durch die Bestimmung der "Adenylate energy charge" (Abk.: AEC) interpretiert werden.

Dieser Parameter besagt, daß die metabolisch verfügbare Energie einer Zellpopulation direkt korreliert ist mit dem darin enthaltenen molaren Anteil ATP und halbmolaren Anteil ADP (CHAPMANN et al., 1971).

Diese "Adenylsäure-Energie-Ladung" definieren ATKINSON und WALTON (1967):

$$AEC = \frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Unter physiologischen Lebensbedingungen halten Zellen das Verhältnis ihrer Nucleotidkonzentrationen in

engen Grenzen. Deshalb kann eine Verschiebung des AEC als Folge veränderter Lebensumstände interpretiert werden (CHAPMAN et al., 1971; HOLM-HANSEN und KARL, 1978).

Bei Untersuchungen an Bakterien der Gattung Escherichia coli während des Wachstums wurde ein AEC von 0,8 ermittelt. Lag ihre energetische Ladung zwischen 0,8 und 0,5, so waren die Bakterien noch in der Lage, Kolonien zu bilden. Bei niedrigeren Werten starben sie jedoch ab (CHAPMAN et al., 1971).

Unter diesem Gesichtspunkt wurden außer Bakterien auch Meeresorganismen, pflanzliche und tierische Gewebe erforscht. Zellen verschiedensten Ursprungs wiesen während ihres Wachstums meist AEC-Werte um 0,85 auf, während unter einem AEC von 0,5 oft der Tod eintrat (CHAPMAN und ATKINSON, 1977; KARL und HOLM-HANSEN, 1978). Weiter konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit einer Zelle zur Proteinsynthese mit dem AEC-Wert enger korreliert, als mit ihrer absoluten ATP-, ADP- oder AMP-Menge (SWEDES et al., 1975).

Projiziert man diese Erkenntnisse auf Spermien, so könnte der AEC-Parameter für die Beurteilung des Zellstoffwechsels besser geeignet sein, als der Nach-

weis des absoluten ATP-Gehaltes.

2.2. Die Biolumineszenz

2.2.1. Geschichte der Biolumineszenz

Schon vor Christi Geburt beschreibt Aristoteles (384 - 322 v.Ch.) in seinem Werk "De Anima" das Leuchten von toten Fischen (Bakterien) und Pilzen. Fast zwei Jahrtausende später entstehen im 17. Jahrhundert die ersten eingehenderen Abhandlungen über das Phänomen leuchtender Tierchen. Vor allem FRANCIS BACON (1561 - 1626) beschäftigte sich in seinem Werk "Topica inquisitionis de luce et lumine" mit der Lumineszenz. In Kapitel 12 schreibt er: "Glühwürmchen und der Tau des Salzwassers ..... leuchten, doch sind sie nicht heiß, berührt man sie"; und weiter im Kapitel 30: ".... ihr Lebensgeist ist sicher eine Substanz bestehend aus luftiger und flammender Materie". BACON berichtet auch von Feuerfliegen aus Italien (HARVEY, 1915, 1928).

Die Pionierarbeit in der Erforschung der Biolumineszenz von Feuerfliege und Venusmuschel leistete

DUBOIS im 19. Jahrhundert (DUBOIS, 1885).

Als biologisches Nachweisverfahren wurde die Biolumineszenz erstmals von HARVEY (1915, 1928) angewandt. Er zeigte an lumineszierenden Bakterien (Achromobacter fisheri) die Wirkung von Enzymen auf die Stoffwechselaktivität von Pflanzen.

Daß ATP die Leuchtorgane von Glühwürmchen zur Lichtemission anregt, entdeckte MCELROY (1947). Auf dieser Erkenntnis aufbauend, entwickelten STREHLER und TOTTER (1952) die Biolumineszenz als enzymatisches Analyseverfahren zur In vitro-Bestimmung von Stoffwechselprodukten. Diese drei Autoren brachten die Forschung um eine Klärung der Biolumineszenz in Gang.

Unter den zur Lumineszenz befähigten Organismen sind die bekanntesten das Glühwürmchen und die amerikanische Feuerfliege. Doch wird heute angenommen, daß fast zwei Drittel aller in den oberen 2000 Metern der Ozeane existierenden Lebewesen über das Phänomen der Biolumineszenz verfügen. Hier reicht das Spektrum von Bakterien über Plankton bis zu leuchtenden Fischen (WHITEHEAD et al., 1979).

2.2.2. Das Wesen der Biolumineszenz

Ein Atom kann durch Energiezufuhr von seinem Grundpotential auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Es nimmt dabei Energiequanten auf, die häufig in Form von Photonen wieder abgegeben werden. Das vorübergehend angeregte Atom kehrt auf seinen energetischen Grundzustand zurück und sendet Licht aus (HAMMER und HIMPSEL, 1962). Eine dafür nötige Energie kann ausgehen von: Temperatur, korpuskulärer Strahlung, Kristallspaltung, Reibungskräften, elektrischen Feldern, exergonischen chemischen Reaktionen, etc. (SELIGER, 1978).

Senden die Reaktionssysteme von Zellen organischer Herkunft Photonen aus, spricht man von Biolumineszenz. In allen biologischen Leuchtreaktionen trägt eine Oxidation zu der Energie bei, die in der Lage ist, ein Molekül in einen angeregten Zustand zu versetzen (SELIGER, 1978). Die Lumineszenz der amerikanischen Feuerfliege (photinus pyralis) ist das heute bestererforschte System. Darauf basiert das in vorliegender Arbeit eingesetzte Verfahren.

Die lichterzeugende Reaktion ist die Aktivierung von Luciferin (LH_2) in Anwesenheit von ATP, Mg-Ionen und

Luciferase (E) zur Bildung eines an die Luciferase gebundenen Luciferyladenylat (Abb. 5,1). Daraufhin reagiert dieser Luciferase-Luciferin-AMP-Komplex mit molekularem Sauerstoff. Dabei wird Licht ausgestrahlt, und es entstehen als Produkte CO_2, AMP und Oxyluciferin (Abb. 5,2)(DELUCA, 1976; DELUCA und MCELROY, 1978).

Die Luciferase kann auch die Bildung von Dehydroluciferyladenylat (L) katalysieren (Abb. 5,3). Daraus resultiert eine Lichtemissionsabnahme, da Dehydroluciferin die Luciferase hemmt (DELUCA, 1976).

Es konnte gezeigt werden, daß die Oxidation von Luciferin zu einem höheren Energiepotential in Oxyluciferin führt. Das dadurch angeregte Molekül stellt das lichtemittierende Stadium der Reaktion dar (DELUCA und MŒLROY, 1974; THORE, 1979a).

Während der lichtemittierenden Reaktion ist sowohl AMP, als auch die Luciferase noch gebunden. Dies wird aus der Tatsache geschlossen, daß beide Substanzen die Wellenlänge und damit die Farbe des ausgestrahlten Lichtes beeinflussen können (SELIGER und MCELROY, 1964; DELUCA et al., 1973).

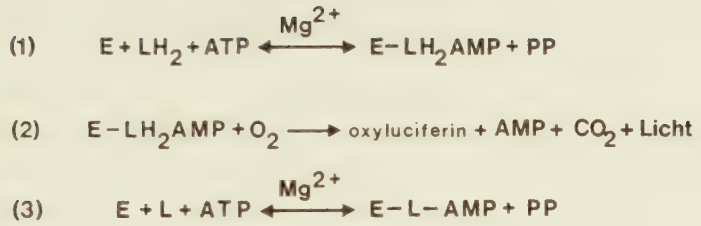
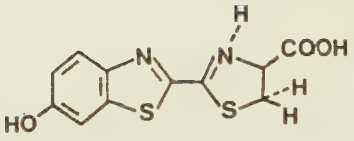


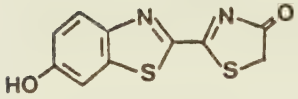
Abb. 5: Die lichtemittierende Reaktion während der Biolumineszenz

Die Quantenausbeute (Quotient aus der Zahl der emittierten Photonen und der Zahl der umgesetzten ATP-Moleküle) ist nahezu 100%.

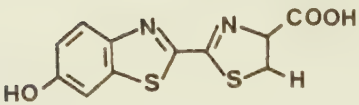
Die durch die Luciferase katalysierte Reaktion beginnt schnell und verläuft dann relativ langsam. Bei einer ATP-Konzentration von 10^{-9} Mol ergibt sich ein Photonenstrom von 5 x 10^{7} Photonen/ ml^{-1}/s^{-1}. Daraus resultiert eine ATP-Abnahme von 0,5 % pro Minute.



D(-) Luciferin



Oxyluciferin



Dehydroluciferin

(nach DeLuca,1976)

Abb. 6: Die Struktur von d-Luciferin, Oxyluciferin und Dehydroluciferin

Dieser langsame ATP-Schwund bedingt über lange Zeit ein fast konstantes Lichtsignal (DELUCA et al., 1973).

Obwohl die Luciferase eine hohe Spezifität für ATP aufweist, können auch andere Nucleotide wie Cytidin-5-triphosphat, Inosin-5-triphosphat und iso-ATP eine Lichtemmission hervorrufen (WHITEHEAD et al., 1979).

2.2.3. Reaktionsbedingungen

2.2.3.1. Meßoptimum

Um exakte Meßergebnisse zu erzielen, soll die ATP-Konzentration einer Probe im Bereich von 10^{-6} Mol und darunter liegen (LUNDIN et al., 1976). Die Angaben für kleinste registrierbare ATP-Mengen schwanken von 10^{-14} Mol (DELUCA und MCELROY, 1978) bis 10^{-17} Mol (CHAPELLE und LEVIN, 1968). Zwischen 10^{-6} Mol und 10^{-14} Mol bewegt sich die Reaktion in einem Bereich in dem sich die Lichtemission zum ATP-Gehalt linear verhält.

Das pH-Optimum der Luciferase liegt bei 7,5. Dabei erzeugtes Licht hat eine Wellenlänge von 560 nm. Zur Stabilisierung des Reaktionssystems wird der Zusatz von Rinderserumalbumin empfohlen (WHITEHEAD et al., 1979).

Das Enzym Luciferase entfaltet seine optimale katalytische Wirkung zwischen 20°C und 25°C und benötigt zweiwertige Kationen (WHITEHEAD et al., 1979). Folgende Ansätze haben sich in der Praxis für Tests bewährt:

Tris-Azetat Puffer ad pH 7,75	50 mM
EDTA	1,5 mM
Rinderserumalbumin	0,075 % (w/v)
Magnesiumazetat	10 mM
D-Luciferin	35 µM
Luciferase	0,05 - 0,5 µg Enzymprot./ml

(RASMUSSEN, 1978; BOEHRINGER, 1979)

2.2.3.2. Hemmende Faktoren

Ein pH im saueren Bereich wirkt sich auf die Luciferase, wie auf die Wellenlänge des emittierten Lichtes ungünstig aus. Verläßt man den optimalen pH von 7,75, verliert das Enzym an Wirksamkeit und die Lichtwellen werden länger. Da Photozellen auf blaues, kurzwelliges Licht empfindlicher reagieren als auf rotes, ist eine pH-Änderung möglichst zu vermeiden

(LUNDIN et al., 1976; THORE, 1979a).

Monovalente Anionen können die Biolumineszenz hemmen. Sie lagern sich der Luciferase an und verdrängen die das Enzym aktivierenden Mg-Ionen. Es kommt zu einer kompetitiven Hemmung. Folgende Rangfolge in der inhibitorischen Effektivität der Anionen läßt sich erstellen:

$$SCN^- \quad I^- \quad NO_3^- \quad Br^- \quad Cl^- \quad Ac^-$$

(DENBURG und MCELROY , 1970; GILLES et al., 1976).

Während der ATP-Bestimmung im Luciferin-Luciferase-system entstehen als Reaktionsprodukte unter anderem Pyrophosphat, AMP, Oxyluciferin und Dehydroluciferin. Fallen diese Substanzen in hohen Konzentrationen an, wirken sie sich hemmend auf die Lichtemission aus. Da es sich bei den genannten Stoffen um Produkte der Biolumineszenzreaktion handelt, wird diese Erscheinung "Produkthemmung" genannt (DELUCA und MCELROY, 1974; GATES und DELUCA, 1975; DELUCA, 1976).

AMP führt ab einer Konzentration von $2{,}4 \times 10^{-4}$ Mol zu einer Minderung der Lumineszenz (LEE et al., 1970).

Das bei der Oxidation von Luciferin entstehende Oxyluciferin wirkt kompetitiv hemmend (GATES und DELUCA, 1974; GOTO et al., 1973).

Pyrophosphat kann bei niedriger Konzentration die Lichtemission auch steigern (MCELROY et al., 1953).

Auch die Reaktion der Phosphotransferasen Pyruvatkinase und Myokinase, die zum Nachweis von ADP und AMP eingesetzt werden, indem sie aus diesen Metaboliten ATP resynthetisieren, ist vom Medium abhängig. Sie wird z.B. von Ammoniumsulfat durch einen verringerten ATP-output gestört (THORE, 1979a).

Neben chemischen Einflüssen können Substanzen, deren Absorptionsspektren sich mit dem Emissionsspektrum des Luciferin überlagern zu physikalischen Störungen führen (DELUCA, 1978).

2.2.4. Meßgerät

Aus der Vielfalt der für Lichtmessungen zur Verfügung stehenden Geräte zeigt die "Photonenvervielfältigerröhre" (photomultiplier tube) die größte Empfindlichkeit. Bei ihr löst ein Photon an der Photokathode einen Anodenstrom von 10^6 Elektronen aus. Der in der Photoröhre entstehende Strom kann dann von einem "Amplifier" verstärkt werden. Die aus dem Ver-

stärker kommenden Signale werden über Anzeigegeräte sichtbar gemacht (ANDERSON et al., 1978).

Unter anderem stellen folgende Firmen Photometer für die Messung der Biolumineszenz her:

American Instrument Company,
E.I. Du Pont Company,
LKB-Wallac Instrument GmbH,
Lumac Systems AG,
Packard Instruments,
SAI Technology Company,
Vitatect Company,
Zinsser Analytic GmbH

2.2.5. Die Kinetik einer ATP-Messung

2.2.5.1. Mit Reinsubstanzen

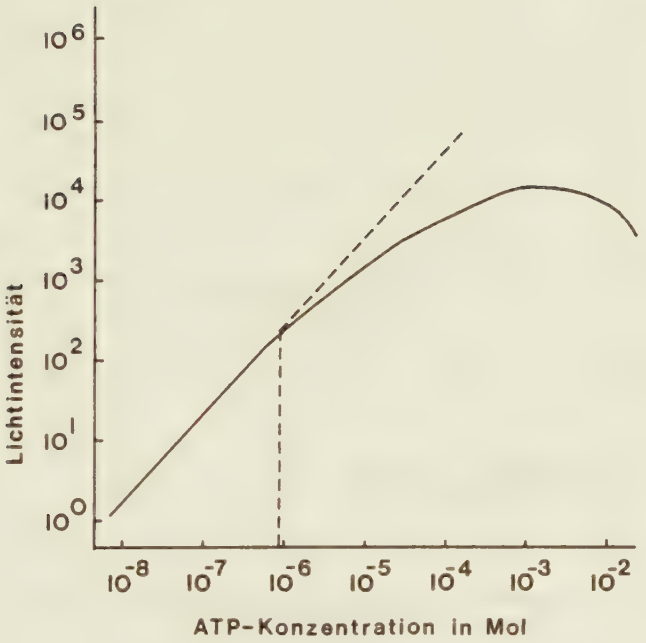
Unabhängig von der Konzentration der beteiligten Reaktionspartner verstreichen nach dem Zusammenbringen des Luciferin-Luciferasegemisches mit ATP etwa 25 msec, bis die ersten Photonen ausgestrahlt werden. Nach 0,25 bis 0,3 Sekunden ist bereits die maximale Lichtemission erreicht (DELUCA und MCELROY , 1974). Da-

nach stellt sich im optimalen Konzentrationsbereich (10^{-6}Mol ATP) ein ATP-Schwund von 0,5 bis 1 %/min. ein. Dies bedeutet über längere Zeit ein nahezu konstantes Lichtsignal. Bei einer ATP-Konzentration von mehr als 10^{-6} Mol tritt die Produkthemmung ein (LUNDIN et al., 1976). Dann verhält sich die Lichtemission nicht mehr proportional zum ATP-Gehalt (Abb. 7).

2.2.5.2. Mit Sperma

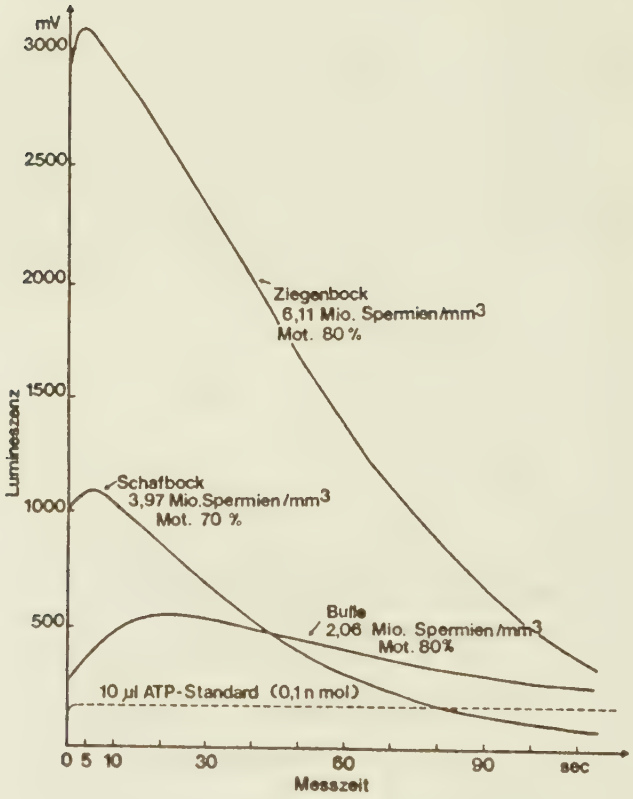
Wird in nativem Sperma ATP durch die Biolumineszenz ermittelt, ist eine gänzlich andere Reaktionskinetik zu beobachten (PFETSCH, 1979). Zuerst kommt es zu einem steilen Lumineszenzanstieg, der nach mehreren Sekunden in ein Plateau mündet, um dann fast ebensoschnell wieder abzufallen (Abb. 8). Bereits nach einer Minute Meßdauer sind die ursprünglich registrierten ATP-Werte häufig um mehr als die Hälfte reduziert, und nähern sich im weiteren Verlauf asymptotisch dem Null-Wert.

PFETSCH begründet den anfänglichen Biolumineszenzanstieg bei der ATP-Messung in Spermien mit einer Per-



(nach Lundin et al.,1976)

Abb.7: Der Einfluß der ATP-Konzentration auf die Intensität der Biolumineszenz



(nach Pfetsch, 1979)

Abb. 8: Die Reaktionskinetik von nativem Rind-, Schaf- und Ziegensperma

meabilitätserhöhung der Zellwände nach Reaktionsbeginn. Dies ermöglicht ein Eindringen des Luciferin-Luciferase-Reagenz oder eine Freisetzung des ATPs aus dem Zellinneren. Das mit einer Verzögerung von mehreren Sekunden auftretende Lumineszenzmaximum ist demnach eine Folge der zu Reaktionsbeginn rasch zunehmenden Spermienwandpermeabilität. Parallel dazu laufen von Anfang an ATP-spaltende Vorgänge ab. Dies geschieht durch im Seminalplasma enthaltene Substanzen. Sind ATP-freisetzende und -abbauende Prozesse im Gleichgewicht, stellt sich ein Lumineszenzplateau ein, das in eine ATP-Abnahme mündet, wenn die Wirkung der ATPasen überwiegt. Das Kurvenmaximum ist abhängig von der Anzahl lebender Zellen und den in der Probe enthaltenen Nucleotidasen. Diese beeinflussen auch die Geschwindigkeit eines ATP-Abfalls (PFETSCH, 1979).

2.2.6. Enzymatische Umwandlung von ADP und AMP in ATP

Die Entwicklung des Biolumineszenznachweises für die ATP-Messung macht es möglich, auch ADP und AMP mit diesem Verfahren zu bestimmen.

Da aber nur ATP in der Lage ist, eine Luciferin-Luciferasereaktion auszulösen, ist zuerst eine Umwandlung des Di- bzw. Monophosphates in das Triphosphat nötig. Dies kann auf enzymchemischem Weg durch die Phosphotransferasen Pyruvatkinase und Myokinase geschehen (HOLM-HANSEN und KARL, 1978).

ADP wird von dem Enzym Pyruvatkinase (ATP: pyruvate -2-O-phosphotransferase, Abk.: PK, E.C. (enzym comission) 2.7.1.40) in Anwesenheit des Phosphatlieferanten Phosphoenolpyruvat (PEP) in ATP verwandelt. Die Transferase katalysiert folgende Reaktion:

$$ADP + PEP \xleftrightarrow{PK} Pyruvat + ATP$$

(BERGMEYER, 1974)

Die Pyruvatkinase kann mit ADP, IDP (Inosindiphosphat) und GDP (Guanosindiphosphat) reagieren und ist spezifisch für Phosphoenolpyruvat. Zu einer vollen Aktivitätsentfaltung benötigt sie Mg^{2+} (Mn^{2+}, Co^{2+}) und K^{+} (NH_4^{+}, Rb^{+}) Ionen (BERGMEYER, 1974).

Die Pyruvatkinase ist ein Enzym der Glykolyse. Das Gleichgewicht obiger Reaktion liegt bei einer Michaelis-Menten-Konstanten von $K_{(mM)} = 2.10^3/30^{o}C$ auf der

Seite von Pyruvat und ATP (MEYERHOF und OESPER, 1949).

Um AMP für eine Biolumineszenz verfügbar zu machen, muß es zuerst in ADP und weiter in ATP verwandelt werden.

Die Phosphotransferase Myokinase (ATP : AMP phosphotransferase, Abk.: MK, E.C. 2.7.4.3., andere Bezeichnung: Adenylatkinase) bildet aus AMP und ATP ADP. Die Gesamtreaktion zur ATP-Synthese aus AMP lautet:

$$AMP + ATP \xleftrightarrow{MK} 2ADP \qquad (1)$$

$$2ADP + 2PEP \xleftrightarrow{PK} 2ATP + 2Pyruvat \qquad (2)$$

Das Gleichgewicht der Reaktion (2) liegt soweit rechts, daß sie bereits für sich die, mit ca. 66 % links liegende ADP-Dismutation in (1) ausgleichen kann und somit alles AMP erfaßt wird (JAWOREK et al., 1974).

2.2.7. Die Biolumineszenzmessung von ADP und AMP

Um in einem Gemisch aus ATP, ADP und AMP alle drei Nuccleotide nacheinander bestimmen zu können, ist Voraussetzung, daß der ATP-bedingte "lightoutput" mehrere Minuten konstant bleibt. Der Grund für diese Forderung liegt in der trägen Umwandlung von ADP und AMP in ATP. Die Enzyme Pyruvatkinase und Myokinase benötigen dazu einige Minuten. Würde es währenddessen bereits zu einem Abfall der ATP-Primärlumineszenz kommen, könnte nach erfolgter ADP- und AMP-Umwandlung zu ATP und dessen Addition zum "Anfangs-ATP" die theoretische Gesamtlumineszenz nicht erreicht werden.

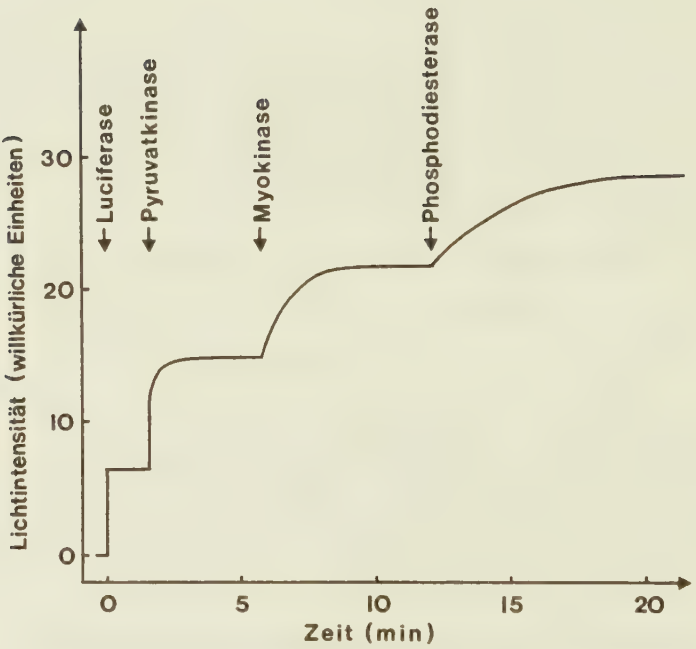
Ein solch ungünstiger ATP-Schwund tritt vor allem auf, wenn Adenosinnucleotid-abbauende Enzyme in einem Probengemisch vorhanden sind. Weiter bedingen hohe Nucleotidkonzentrationen eine Produkthemmung, verbunden mit Lumineszenzinhibierung, woraus ein scheinbarer ATP-Abfall resultiert. Treffen also ATP-Synthese und ATP-Abbau in einer Meßprobe aufeinander, kommt es zu Überlagerungen, die die Genauigkeit einer Analyse beeinträchtigen. Diesem Effekt ist bei einem ADP- oder AMP-Nachweis besondere Aufmerksamkeit zu schenken (LUNDIN et al., 1976).

Bei sehr niedrigen Nucleotidkonzentrationen kann die Zeit für ein vollständiges Ablaufen einer Myokinasereaktion verlängert sein. LUNDIN et al. (1976) forderte deshalb als günstigsten Bereich eine Menge von 10^{-6} bis 10^{-7} Mol AMP in einer Probe.

Um die Enzyme Pyruvatkinase und Myokinase durch Ionen zu aktivieren und um ein optimales Reaktionsmilieu zu schaffen, wird folgendes Puffer-Luciferin-Luciferasegemisch empfohlen (LUNDIN et al., 1976):

20	mM	Tris-H_2SO_4 ad pH 7,75
2	mM	EDTA
12	mM	K_2SO_4
10	mM	$MgSO_4$
0,1	mM	Phosphoenolpyruvat
0,1%	(w/v)	Rinderserumalbumin
1,4 x 10^{-5}	M	Luciferin
10	µl	Luciferase

Nach dem Start der Biolumineszenzreaktion wird die, durch das ATP einer Probe hervorgerufene Lichtemission, registriert, darauf werden 5 Units Pyruvatkinase zur Ermittlung des ADPs und anschließend 250 Units Myokinase zur AMP-Feststellung zugegeben (Abb. 9). Durch Zugabe von Phosphodiesterase kann



nach Lundin et al.,1976

Abb. 9: Die Umwandlung von ADP, AMP und cAMP in ATP mit gleichzeitiger Biolumineszenzmessung von ATP

darüberhinaus auch cyklisches AMP bestimmt werden. Unter diesen Voraussetzungen ist die Lichtemission einer Analyseprobe ihrem Adenosinnucleotidgehalt direkt proportional (LUNDIN et al., 1976).

2.3. Probenpräparation

Der ATP-Umsatz in intakten Zellpopulationen verläuft äußerst rasch. Bakterien weisen eine "ATP-turnover Rate" pro Minute auf, die das 450fache der ATP-Menge beträgt, die gleichzeitig in allen Zellen vorhanden ist (HOLMS et al., 1972). Diese Schnellebigkeit des ATPs erfordert zu seiner exakten Erfassung sowohl ein augenblickliches Abstoppen aller die Nucleotide verändernden Vorgänge, als auch seine vollständige Extraktion aus den Zellen zur Bereitstellung für eine Biolumineszenzreaktion.

Während einer enzymatischen Analyse kommt es häufig zu einer Zustandsänderung von Zellen, die mit einer Konzentrationsverschiebung der zu ermittelnden Substanzen gepaart ist. Jede Meßmethode wird dann zu einem "operational test" ; d.h. ein theoretisch erreichbares Ergebnis wird während eines Testverlaufes

verändert (HESS und BRAND, 1974). Im Sperma bedarf vor allem das exzessive Vorkommen von Nucleotidasen besonderer Beachtung.

Bei der Vorbereitung einer Probe zur Messung kommen deshalb Verfahren zum Einsatz, die ATP, ADP und AMP freisetzen und eine Beeinträchtigung durch Nucleotidasen ausschließen. Diese Anforderungen des Zellaufschlusses und einer Denaturierung werden bei einer Verwendung von Lösungsmitteln (Äthanol, Butanol), Säuren (Trichloressigsäure, Perchloressigsäure), Detergentien oder Hitze erfüllt (THORE, 1979b).

In vorliegender Arbeit werden die Möglichkeiten einer Hitzedenaturierung und der Einsatz eines Detergens überprüft.

2.3.1. Zellaufschluß

Das Erhitzen von Zellen führt über eine Zerstörung der Wandstrukturen zu einer Permeabilitätserhöhung. Große Moleküle können die Zellmembran leichter passieren. Es fluten Nucleotide aus, und Biolumineszenzsubstanzen können in die Zellen eindringen, um dort zu reagieren.

Die Extraktion von ATP durch Detergentien beruht auf deren oberflächenaktiver Wirkung. Eine Spannungsminderung zwischen Zellwandmolekülen steigert auch hier die Permeabilität. Als Detergens wird das "Nucleotide releasing reagent for somatic cells" (Abk.: NRS) verwendet. Der Hersteller beschreibt diese Substanz wie folgt: "NRS macht die Wand von Körperzellen für kleine Moleküle durchlässig und setzt diese in Sekunden frei. Adenosinnucleotide als kleinmolekulare Substanzen werden somit für eine Biolumineszenzmessung verfügbar. Der Verlust an Adeninenergieträgern bedingt den Untergang somatischer Zellen; ihre äußere Form bleibt jedoch erhalten. Die ausschließliche Wirkung des Detergens auf Körperzellen ermöglicht ein selektives Messen von ATP. Nucleotide aus Bakterien werden nicht freigesetzt" (LUMAC SYSTEMS, Produktinformation, 1977).

2.3.2. Nucleotidasendenaturierung

In einem vorangehenden Kapitel (2.1.7.) wurde über ein gehäuftes Auftreten von Nucleotidasen in Sperma berichtet. Sie stören durch ihren ATP-, ADP- und

AMP-Abbau während einer Luciferin-Luciferasereaktion die exakte Ermittlung der Adenosinnucleotide.

Die katalytische Fähigkeit von Enzymen kann durch Hitzebehandlung zerstört werden. Alle Enzyme gehören zur biochemischen Gruppe der Proteine. Sie werden bei Temperaturen von 60°C und darüber denaturiert (KARLSON, 1974). Die im Sperma vorkommenden Nucleotidasen sind verschieden empfindlich für Hitze, werden aber alle bei Erwärmung auf + 100°C inaktiviert. Damit kann ihr störender Einfluß auf die Biolumineszenz vermieden werden.

2.4. Die Tiefgefrierung von Spermien

2.4.1. Die Auswirkungen unterschiedlicher Glyzerinkonzentrationen auf Spermien

Das Tiefgefrieren wirkt sich schädigend auf Spermien aus. Werden Samenzellen auf -196°C abgekühlt, gefriert zuerst H_2O, und es häufen sich freie Ionen in der Zellumgebung an, bis auch die Restlösung erstarrt ist. Die dabei entstehende pH-Änderung kann zur Denaturierung der Lipoproteine der Spermienwand führen. Bei

zunehmender Temperaturerniedrigung entstehen nacheinander verschiedene Kristallformen. Diese Umkristallisation führt zu einer mechanischen Alteration der Spermien (PAUFLER et al., 1974).

Der ungünstige Einfluß von Temperaturen unter dem Gefrierpunkt wird durch den Zusatz von Glyzerin abgeschwächt. Das Glyzerin bindet freies Wasser; dadurch wird die, durch eine Hypertonie schädigende Anreicherung von Elektrolyten in der Zellwandumgebung verhindert (HAYDN, 1968).

Als Optimum gilt z.B. für Bullensperma bei Verwendung eines Eidotter-Natrium-Zitratverdünners eine Endkonzentration von 7,0 - 8,0 % Glyzerin (MILLER und VANDEMARK, 1953; EIBL, 1959; SALISBURY und VANDEMARK , 1961). HAYDN (1968) fand den höchsten Prozentsatz motiler Spermien nach dem Auftauen bei einem Glyzerinanteil von 4,8 %.

Von FOULKES und MACDONALD (1979) sind Ergebnisse über den Einfluß des Tiefgefrierens auf den ATP-Gehalt von Bullenspermien bekannt. Sie fanden in Spermien, die mit 4,7 % Glyzerinanteil in der Endverdünnung tiefgefroren waren, einen ATP-Abfall von

durchschnittlich 76,5 nmol ATP/10^8 Spermien in Nativsperma auf 10,0 nmol ATP/10^8 Spermien nach dem Auftauen.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

3.1.1. Spermaspender

Das Sperma wurde von Bullen (Deutsches Fleckvieh, Braunvieh), Schafböcken (Merinolandschaf, Deutsches schwarzköpfiges Fleischschaf), Ziegenböcken (Deutsche bunte Edelziege), Eber (Deutsche Landrasse), Hengst (Traber), Kaninchenbock (Weißer Neuseeländer) und Hahn (Weißes Leghorn) gewonnen.

Das Humansperma wurde von der andrologischen Abteilung der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Spermagewinnung

Alle Versuchstiere - mit Ausnahme des Hahns - wurden mit Hilfe einer künstlichen Scheide deseminiert. Als Aufsprungpartner diente ein männliches Tier derselben Spezies oder ein Phantom. Das Sperma vom Hahn

wurde durch Massage gewonnen. Die Ejakulate wurden nach ihrer Gewinnung voruntersucht und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die ATP-Messung von Frischsperma erfolgte nach Möglichkeit sofort nach der Gewinnung, spätestens jedoch innerhalb der ersten Stunde nach Erhalt des Samens.

3.1.3. Die Voruntersuchung der Ejakulate

Die Ejakulate wurden unmittelbar nach der Gewinnung nach folgenden Kriterien beurteilt:

I. Makroskopisch
   1. Volumen (ml)
   2. Farbe
   3. Konsistenz
   4. Wolkenbildung
   5. Beimengungen

II. Mikroskopisch
   1. Subjektive Beurteilung (Nativpräparat)
      a) Motilität
         Massenbewegung
         Einzelbewegung - Vorwärtsbew. (%)

- Ortsbewegung (%)
- pathol. Bew. (%)

b) Dichte

c) Agglutinationen

d) Morphologie

e) Fremdzellgehalt

f) Beimengungen

2. Zählung bzw. Differenzierung

a) Morphologie (Tuscheausstriche; 300 Spermien / Probe)

b) Lebend-Tot Färbung (Bromphenolblau, 300 Spermien / Probe)

c) Fremdzellen (z.B May-Grünwald Färbung)

d) Dichte (Zählkammer nach Burker-Türk; Spermienanzahl / mm^3)

Die unter II. 2. genannten Verfahren und darüberhinausgehenden chemisch-physikalischen biologischen oder mikrobiologische Untersuchungen wurden nur bei Bedarf, nicht aber routinemäßig, angewandt.

3.2. Methodik und ihre Erarbeitung

3.2.1. Messung und Errechnung einer ATP-Menge

3.2.1.1. Meßprinzip

Das Enzym Luciferase katalysiert folgende Reaktion (Kap. 2.2.2.)

$$\text{ATP} + \text{D-Luciferin} + O_2 \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Luciferase}}$$

$$\text{Oxyluciferin} + \text{PP} + \text{AMP} + CO_2 + \text{Licht}$$

Während einer Lumineszenzreaktion werden von angeregten Molekülen bei ihrer Rückkehr auf das Energiegrundniveau Photonen emittiert. Diese Photonen werden von einem Lichtdetektor (photomultiplier tube) registriert, in elektrische Signale verwandelt, verstärkt und an Anzeigegeräte weitergegeben.

b) Meßgerät

Die ATP-Bestimmung wurde mit einem Lumineszenzphotometer, dem "Luminometer 1250 - 001" der Firma LKB-

Wallac, Turku,Finnland durchgeführt.

Die kleinste meßbare ATP-Menge beträgt bei diesem Gerät unter Verwendung der Luciferin-Luciferase reagenzien von LKB 4 x 10^{-12} Mol ATP. Sein Anzeigebereich reicht von 0 bis 10000 mV. Ein eingebauter Signalanzeiger arbeitet in Intervallen von einer Sekunde. An das Meßgerät angeschlossen ist ein Digitalanzeiger - Display unit and printer 1250 - 101 LKB - und ein 1-Kanal Flachbrettschreiber, der "Potentiometric recorder 2210 - 032 LKB". Alle Werte erscheinen in mV.

3.2.1.3. Meßreagenzien

Für die Lumineszenzreaktionen fand ein Luciferin-Luciferase Präparat der Firma LKB Verwendung, das aus photinus pyralis (amerikanische Feuerfliege) gewonnen wird. Die lyophilisierte Substanz mit der Bezeichnung ATP-Monitoring Reagent (AMR) beinhaltet neben l- und d-Luciferin, Luciferase, Magnesiumazetat und Rinderserumalbumin. Das Lyophilisat ist bei -20°C mehrere Monate haltbar und wird zum Gebrauch in destilliertem Wasser gelöst.

Als ATP-Eichsubstanz diente reines lyophilisiertes Adenosintriphosphat (ATP Standard LKB 1250 - 122), das in Aqua dest. auf die Konzentration einer 1 x 10^{-5} molaren Lösung eingestellt wird. ATP-Moleküle sind sehr instabil und gelöst nur im Eisbad mehrere Stunden haltbar.

In einigen Untersuchungen kam ein Zellwandaufschluß-reagenz zur Anwendung. Die Substanz mit der Bezeichnung "NRS" (Nucleotide releasing substance for somatic cells) der Firma Lumac Systems AG, Zolder Belgien, soll Zellwände für Moleküle durchlässig machen und damit in der Lage sein, Adenosinnucleotide aus Zellen freizusetzen. Soweit Informationen vorliegen, handelt es sich um ein Detergens.

Zur Schaffung eines optimalen Reaktionsmilieus wurden folgende Puffer eingesetzt:

1. Tris-Azetatpuffer

   20 mM Trisaminomethan

   2 mM EDTA

   Essigsäure ad pH 7,75

2. Tris - H_2SO_4-Puffer

20 mM Trishydroxymethylaminomethan

2 mM EDTA

10 mM $MgSO_4$

12,5 mM KCl

H_2SO_4 ad pH 7,75

Die Verwendung von zwei verschiedenen Puffern ergab sich aus der Notwendigkeit, die zur ADP- und AMP-Bestimmung nötigen Enzyme Pyruvatkinase und Myokinase durch Mg- und K-Ionen zu aktivieren. Da diese Ionen die Lumineszenz des Luciferin hemmen, wurde bei einer alleinigen ATP-Messung der magnesium- und kaliumfreie Tris-Azetat-Puffer verwendet.

Bei der Untersuchung der Reaktionsfähigkeit der Luciferin-Luciferase-Reagenzien war ihre Lumineszenz in Tris-H_2SO_4-Puffer am höchsten (= 100 %), bei Tris-Essigsäure-Puffer um etwa 25 % niedriger. Wurden dem Reaktionsmilieu Mg- und K-Ionen zugegeben, nahm die Aktivität der ATP-monitoring-reagent um 10 - 15 % ab (Abb. 10).

Die Pyruvatkinase wird aus Kaninchenmuskel extrahiert und ist in 50 % Glyzerin suspendiert. Sie hat eine spezifische Aktivität von 200 Einheiten/mg bei 25°C.

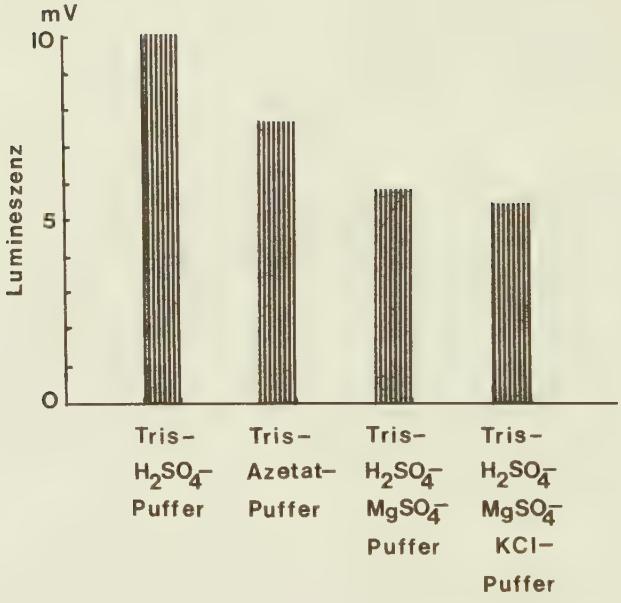


Abb. 10: Der Einfluß verschiedener Puffer auf die Reaktionsfähigkeit des Luciferin-Luciferasereagenz

Ansatz:

200µl AMR + 800µl Puffer + 1µl ATP-Stand. (1×10^{-5} molar)

Ihre Fremdaktivitäten an Glyzerokinase, Hexokinase, NADH-Oxidase, Enolase, Laktat-Dehydrogenase und Myokinase liegen unter 0,01 % (FIRMA BOEHRINGER, MANNHEIM).

Die Myokinase ist aus Kaninchenmuskel isoliert und in Ammoniumsulfat suspendiert. Das Präparat zeigt eine spezifische Aktivität von 360 Einheiten/mg bei 25°C und Fremdaktivität an ATPase unter 0,01 %. Phosphoenolpyruvat liegt als kristallisiertes Mononatriumsalz vor und wurde bei den folgenden Versuchen in Tris-H_2SO_4-Puffer gelöst.

Die einzelnen Methoden zur Bestimmung von Adenosintriphosphat , Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat wurden an Reinsubstanzen überprüft. Die Nucleotide wurden dann in Form von Dinatriumsalzen verwendet und in Tris-Pfuffer gelöst. Pyruvatkinase, Myokinase, Phosphoenolpyruvat, ATP, ADP und AMP wurden von BOEHRINGER, MANNHEIM bezogen.

3.2.1.4. Meßvorgang

200 µl Luciferin-Luciferase Reagenz (AMR) wurden zusammen mit 800 µl Trispuffer in eine Polystyrolküvette pipettiert. Sollte ATP ermittelt werden, wurde der Tris-Azetatpuffer verwendet; bei der Messung von ATP, ADP und AMP der ionenhaltige Tris-H_2SO_4-Puffer. Nach Zugabe von 10 µl (1 µl) einer zu messenden Probe wurde der Gesamtansatz durch Aufsaugen in eine 1000 µl Pipette und durch Zurückgeben in die Küvette durchmischt. Dann wurde die Küvette in die Meßkammer des Photometers verbracht. Durch das Pipettieren und Vermischen erfolgte die erste Messung einer Lichtemission etwa drei Sekunden nach dem Zusammenbringen der Reaktionspartner (Abb. 11).

Das den Meßreagenzien zugesetzte Probenvolumen hing von seinem ATP-Gehalt ab. Um eine Produkthemmung zu vermeiden, wurden von triphosphatreichen Proben 1 µl ($\geq 10^{-5}$ molare Lösungen) ansonsten 10 µl in das Lumineszenzgemisch pipettiert.

Beispiel: Messung der Lumineszenz von 1 µl einer 10^{-5}molaren ATP-Lösung (ATP-Standard)

Testansatz: 200 µl AMR + 800 µl Tris-Puffer + 1 µl ATP-Standard

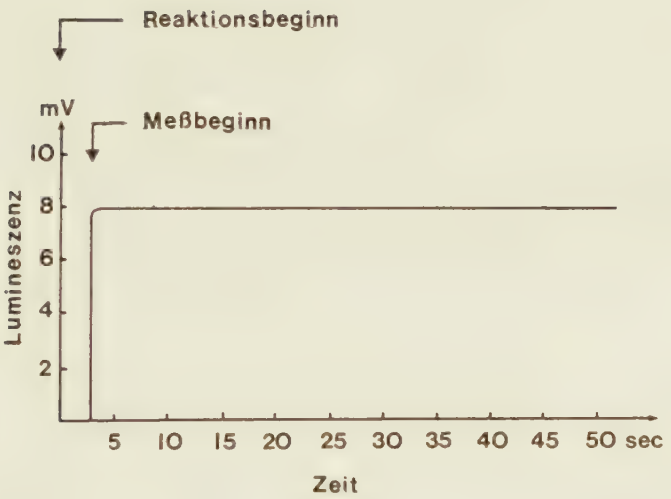


Abb. 11: Kurvenverlauf während der Biolumineszenzmessung von 1 µl einer 10^{-5} molaren ATP-Lösung

Abbildung 11 zeigt die Lumineszenz einer Lösung von ATP in Reinsubstanz. Durch den Pipettier- und Mischvorgang konnte die Messung erst ca. drei Sekunden, nachdem die Reaktion angelaufen war, beginnen. Das Lichtsignal erreichte sofort sein Maximum und blieb mehrere Minuten konstant.

Zur optimalen Erfassung der Gesamtlumineszenz sollte bei dem verwendeten Luminometer das Gesamtvolumen jeder Messung 1 ml betragen. Deshalb wurde bei Zugabe weiterer Reagenzien zu dem oben genannten Ansatz,das Puffervolumen entsprechend reduziert. Die Umgebungstemperatur während der Messungen betrug 22°C; ebenso wurden alle an den Reaktionen beteiligten Substanzen auf Zimmertemperatur gehalten.

3.2.1.5. Errechnung des ATP-Gehaltes einer Probe

3.2.1.5.1. Getrennte Vergleichsmessung

Bei der sogenannten "Getrennten Vergleichsmessung" wird die Biolumineszenz einer Probe, wie z.B. Sperma und diejenige einer ATP-Standardlösung hintereinan-

der ermittelt. Bei diesen Versuchen fand eine 10^{-5} molare ATP-Lösung Verwendung. Von der in mV angezeigten Lichtemission der ATP-Standardlösung kann das ATP des Spermas nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{ATP-Gehalt einer Probe} = \frac{\text{Lumineszenz Probe (mV)} \times 1\text{x}10^{-11}\ \text{M ATP}^*}{\text{Lumineszenz ATP-Standard (mV)}}$$

3.2.1.5.1. Interne Standardisierung

Manche Inhaltsstoffe verändern durch Verschiebung des pH-Wertes oder durch Ioneneinflüsse das Reaktionsmilieu und damit die Biolumineszenzfähigkeit des Systems. Ebenso können ATP-abbauende Enzyme wie ATPasen den tatsächlichen ATP-Gehalt einer Probe während einer Messung verfälschen. Bei einer getrennten Vergleichsmessung sind das ATP der Standardlösung und das der biologischen Probe nicht denselben Einflüssen ausgesetzt. Um etwaige Differenzen zu vermeiden, wird die "Interne Standardisierung" eingesetzt.

*Der ATP-Gehalt von einem Mikroliter einer $1\text{x}10^{-5}$molaren Lösung ist $1\text{x}10^{-11}$ Mol.

Bei diesem Verfahren sind zwei aufeinanderfolgende Messungen eines Küvetteninhalts nötig. Zuerst wird der "lightoutput" von Lumineszenzgemisch mit Sperma gemessen, dann eine ATP-Standardlösung zugefügt und der Wert dieser beiden Komponenten ermittelt. Die Differenz aus den zwei Lichtwerten ist die Lumineszenzerhöhung durch die ATP-Standardlösung (Abb. 12).

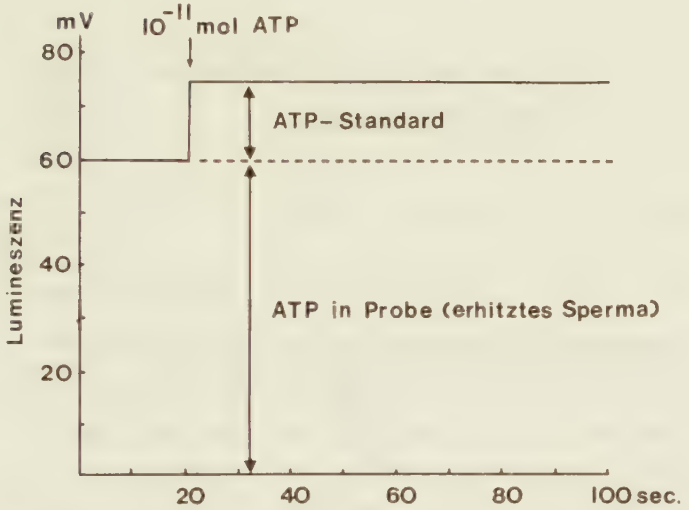
Beispiel : Mit einem µl eines Bullenejakulates mit einer Dichte von 500 000 Spermien/mm^3 wird eine Lumineszenz von 60 mV erreicht. Wird ein µl einer 10^{-5} molaren ATP-Reinlösung dazu pipettiert, steigt das Lichtsignal auf 75 mV. Die Differenz von 15 mV wurde durch den "Internen ATP-Standard" verursacht. Der ATP-Gehalt der Probe wird dann wie folgt errechnet:

$$\text{ATP}_{\text{Spermaprobe}} = \frac{60}{75 - 60} \times 1\text{x}10^{-11}\ \text{M} = 4\text{x}10^{-11}\text{M ATP}$$

500 000 Spermien beinhalteten $4\text{x}10^{-11}$M ATP. In der Literatur ist es üblich, den Nucleotidgehalt für 10^8 Samenzellen anzugeben. In obigem Beispiel bedeutet dies einen ATP-Gehalt von $8\text{x}10^{-9}$ M/10^8 Spermien.

Ansatz für die Interne Standardisierung:

200 µl AMR + 800 µl Puffer + 1 µl Probe (1. Mess.)
dasselbe Gemisch + 1 µl ATP-Standard (2. Mess.)



$$\text{ATP-Gehalt} = \frac{\text{Lumineszenz Probe (mV)} \times 10^{-11}\ \text{mol ATP}}{\text{Lumineszenz ATP-Standard (mV)}}$$

Abb. 12: Die Errechnung des ATP-Gehaltes einer Sperma-probe durch die Interne Standardisierung

Die Interne Standardisierung wurde der getrennten Vergleichsmessung vorgezogen, wenn irgendwelche die Lumineszenzfähigkeit des AMR-Puffergemisches beeinträchtigenden Substanzen in einer Probe vermutet wurden.

3.2.2. Die Präparation einer Spermaprobe für eine Biolumineszenzmessung

3.2.2.1. Das Erhitzen von Sperma

Während einer Biolumineszenzmessung von nativem Bullensperma wird ATP durch Enzyme des Seminalplasmas abgebaut (PFETSCH, 1979). Bei der Bestimmung von ATP in nativem Bullensperma ist eine Minute nach Meßbeginn die Lumineszenz um mehr als die Hälfte des anfänglich registrierten Maximums gesunken (Abb. 8). Um ADP und AMP durch eine Biolumineszenzreaktion zu erfassen, müssen zuerst beide Nucleotide von den Enzymen Pyruvatkinase und Myokinase in ATP verwandelt werden. Diese Umwandlung nimmt mehrere Minuten in Anspruch (s. Kap.: 3.2.3. und 4.). Es war anzunehmen, daß in dieser Zeit die Seminalplasmaenzyme

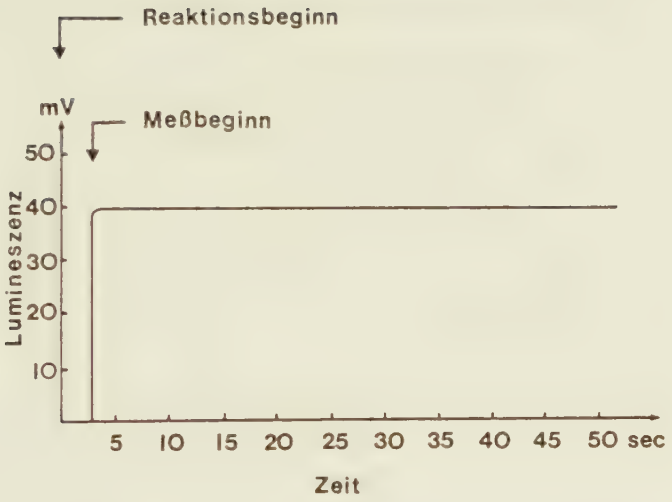


Abb. 13: Kurvenverlauf während der Biolumineszenzmessung von 1 µl einer erhitzten Bullenspermaprobe

einen Großteil der Nucleotide abgebaut hatten und diese für eine Messung nicht mehr zur Verfügung standen. Deshalb wurde an eine Inaktivierung der Sperma-

nucleotidasen durch Erhitzen gedacht.

In Vorversuchen wurde Bullensperma in Reagenzgläsern über der Flamme eines Bunsenbrenners zum Aufkochen gebracht. Bei einer anschließenden ATP-Messung war der, in nativem Sperma sichtbare starke Lumineszenzabfall nach Erreichen des Kurvenmaximums nicht mehr vorhanden. Die Lichtemission einer erhitzten Probe blieb konstant (Abb. 13).

Die in erhitzten und nativen Proben desselben Bullenejakulats gefundenen Werte wichen bei den Vorversuchen stark voneinander ab. Auch variierten die ATP-Gehalte von mehreren hitzebehandelten Proben desselben Bullenejakulats erheblich. Die Ursachen dieser Schwankungen nach Erhitzen des Spermas wurden im Folgenden untersucht, um nach Möglichkeit eine Standardisierung der Vorbehandlung zu erreichen.

3.2.2.1.1. Einfluß des Probenvolumens

Verschiedene Probenvolumina desselben Ejakulats wurden in Reagenzgläschen abgefüllt und gleich lang in kochendes Wasser gehalten. Nach Abkühlen der Proben

auf Zimmertemperatur wurde 1 µl aus jedem Volumen auf seinen ATP-Gehalt untersucht. Je größer das Gesamtvolumen während der Erhitzung einer Probe, desto weniger ATP war feststellbar. Aus Proben mit 20 µl beim Erhitzen konnte dreimal soviel ATP ermittelt werden wie aus einer Probe mit 200 µl (Abb. 14).

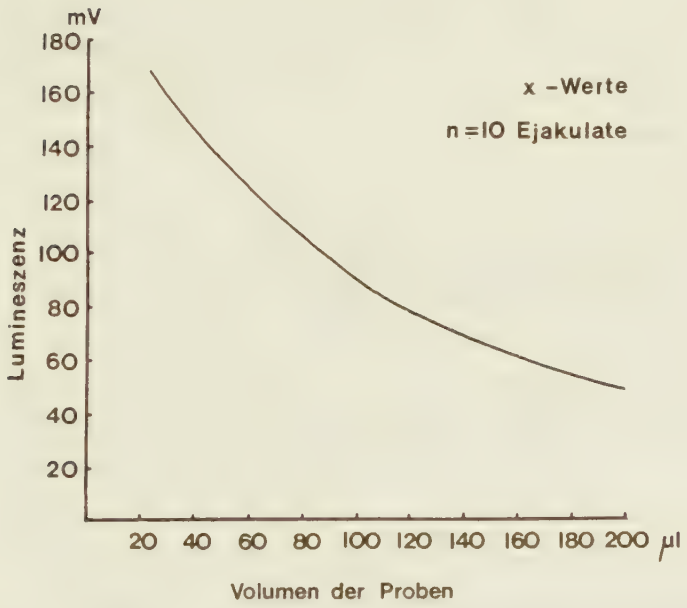


Abb. 14: Abhängigkeit des meßbaren ATP einer Bullenspermaprobe von ihrem Volumen beim Erhitzen

Das Volumen beim Erhitzen war negativ korreliert mit dem anschließend nachweisbaren ATP-Gehalt.

3.2.2.1.2. Einfluß der Erhitzungsdauer

Je 30 Mikroliter desselben Bullenejakulats wurden, in gleiche Reagenzgläser abgefüllt,unterschiedlich lange in siedendes Wasser getaucht. Es sollte die Verfügbarkeit des ATPs für eine Biolumineszenzreaktion nach verschieden langer Erhitzung überprüft werden.

Die durchschnittliche Lumineszenz von nicht erhitztem Sperma betrug 100 mV (Abb. 15). Wurden die Proben eine Sekunde erhitzt, sank die Lichtemission auf ca. 70 mV ab und erreichte bei 2 sekundenlanger Hitzebehandlung mit 20 mV ihren tiefsten Wert. Dauerte die Erhitzung 3 Sekunden, wurden durchschnittlich 45 mV gemessen und bei 4 Sekunden 90 mV. Die ATP-Gehalte von ein-, zwei- und drei-sekundenlang erhitzten Spermaproben waren also gegenüber nativ gemessenen deutlich verringert. Schon nach einer 5 Sekunden dauernden Hitzedenaturierung konnte ein ATP-Gehalt registriert werden, der den von Nativproben übertraf.

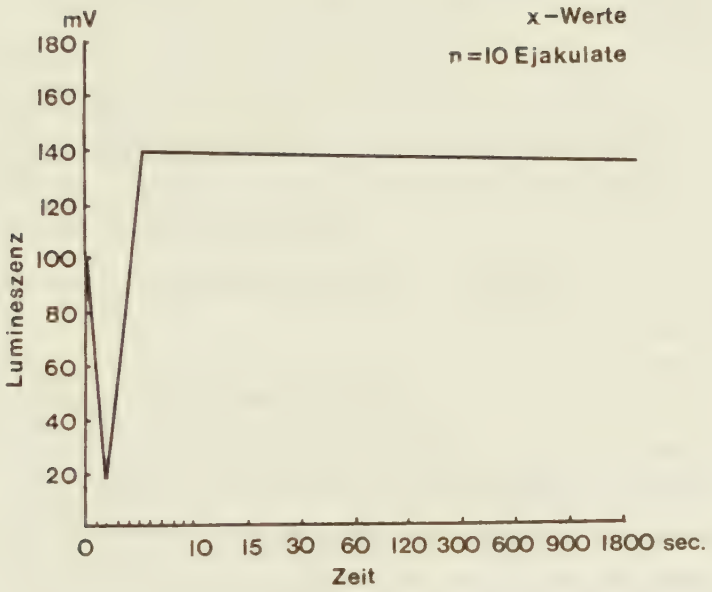


Abb.15: Abhängigkeit des meßbaren ATP einer Bullenspermaprobe von der Dauer des Erhitzens

Zwischen einer 10 Sekunden und mehrere Minuten währenden Erhitzung ergab sich kein Unterschied in der dann meßbaren ATP-Menge. Die Werte nach langdauerndem

Erhitzen lagen etwa 40 Prozent über den Nativwerten.

Stundenlanges Erhitzen bedingte einen leichten ATP-Abfall.

3.2.2.1.3. Auswirkung unterschiedlicher Reagenzgläser

Es wurden Reagenzgläser mit verschiedenen Wandstärken erprobt.

Gleiche Volumina eines Ejakulats wiesen nach gleichlanger Erhitzung in unterschiedlichen Reagenzröhrchen voneinander abweichende ATP-Gehalte auf. Je dicker die Glaswand eines Röhrchens war, desto geringer war das in der Probe meßbare ATP. Für dasselbe Bullenejakulat konnte am meisten ATP ermittelt werden, wenn die Probe in dem dünnsten zur Verfügung stehenden Reagenzglas erhitzt worden war.

3.2.2.1.4. Die Höhe der Temperatur

Das Aufkochen des Spermas durch Halten des gefüllten Reagenzgläschens in die Flamme eines Bunsenbrenners ergab gegenüber einer Erhitzung in kochendem Wasser eine höhere ATP-Ausbeute. Häufig verdampfte oder verkohlte jedoch die Probe. Auch war es nicht möglich die Flammenhitze zu stabilisieren und damit eine Methode zu standardisieren.

Eine Hitzebehandlung durch Eintauchen eines Reagenzglases mit Sperma in ein 250°C heißes Ölbad machte ebenfalls mehr ATP für eine Messung verfügbar. Da Flüssigkeiten, wie Sperma, ohne Druckerhöhung nicht über ihren Siedepunkt hinaus erhitzt werden können, scheinen sich hohe Temperaturen durch die Geschwindigkeit der Erhitzung eines Präparates und nicht durch den absolut erreichten Hitzegrad auf die Meßbarkeit des ATPs auszuwirken.

3.2.2.1.5. Standardisierung des Erhitzungsvorganges

Die in den vorangehenden Abschnitten (3.2.2.1.1.-4.) angeführten Untersuchungen ließen den Schluß zu, daß

die schnelle Erhitzung eines kleinstmöglichen Probenvolumens in einem dünnen Reagenzglas das meiste ATP für eine Messung verfügbar macht. Offensichtlich ist ein rasches Durchlaufen des Temperaturbereichs von 20°C bis 100°C wichtig für eine hohe ATP-Verfügbarkeit bei einer Biolumineszenzmessung.

Das Erhitzen des Spermas bei allen weiteren Experimenten wurde wie folgt standardisiert:

In ein Fiolaxreagenzglas (Fa. Schott, Mainz) mit einer Wanddicke von 0,4 mm und der Abmessung 8 x 70 mm (DIN 12395) wurden 20 µl eines Ejakulats pipettiert und eine Minute in kochendes Wasser gehalten. Zur Vermeidung von Verdunstungseinflüssen wurden die Röhrchen mit Silikonpfropfen verschlossen. Nach Abkühlung wurde ein µl des Koagulums für eine weitere Adenosinnucleotidauswertung verwendet.

3.2.2.1.6. Die Reproduzierbarkeit der Meßwerte von erhitztem Sperma

Bei der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Erhitzung wurde eine Streuung von 3,59 mV, um einen Mittel-

Tab. 4 : Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzmessung von erhitztem Bullensperma

Biolumineszenz-messung von:	Lumineszenz in mV
1 µl eines erhitzten Bullenejakulates	77,0 72,6 73,4 81,7 76,5
$\bar{x}$	76,24
$s\pm$	3,598
VK %	4,719

Meßmodus:

800 µl Puffer + 200 µl AMR + 1 µl erhitztes Sperma

wert von 76,24 mV gefunden; dies ergab einen Variationskoeffizienten von 4,7 %.

3.2.2.2. Die Nucleotidextraktion aus Zellen durch NRS

Die Firma Lumac Systems vertreibt die Substanz NRS, die in der Lage sein soll, Nucleotide aus somatischen Zellen freizusetzen und damit für eine Biolumineszenzreaktion verfügbar zu machen. "Die Detergens-ähnliche Nucleotide releasing substance for somatic cells (NRS)" macht die Zellwand für kleine Nucleotide durchlässig und setzt in Sekunden ATP, ADP und AMP frei" (siehe 2.3.1.).

3.2.2.2.1. Lumineszenzerhöhung durch steigende NRS-Konzentrationen

Nach Firmenvorschrift ist eine dem Probenvolumen gleiche Menge NRS zuzusetzen.

Deshalb wurden zunächst 10 µl NRS und 10 µl natives Bullensperma in das Lumineszenzgemisch pipettiert. Im Vergleich zu einer Probe ohne NRS ergab sich keine Erhöhung des Lumineszenzmaximums.

Deshalb wurde in einer weiteren Versuchsanordnung die Wirkung größerer NRS-Volumina überprüft und Proben desselben Ejakulats 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 800 µl NRS zugesetzt.

Testansatz:
200 µl AMR + 800 µl (Puffer + NRS) + 10 µl Sperma (nativ)

In gleichem Maße wie das NRS-Volumen erhöht wurde, verringerte sich der Puffer, um das Volumen des Reaktionsgemisches nicht zu verändern.

Eine Erhöhung des NRS-Volumens steigerte, abhängig von der Spermiendichte der Proben, den lightoutput. Bullenejakulate mit einer Konzentration bis 200 000 Spermien/mm^3 zeigten die höchste Lichtemission bei 200 µl NRS, wobei eine darüberhinausgehende Zugabe nur mehr eine unbedeutende Steigerung erbrachte (Abb. 16).

Bei dichten Ejakulaten (> 1 000 000 Sp./µl) war dagegen bis zu einer Menge von 800 µl NRS eine fast proportionale Steigerung der Lumineszenz zu beobachten.

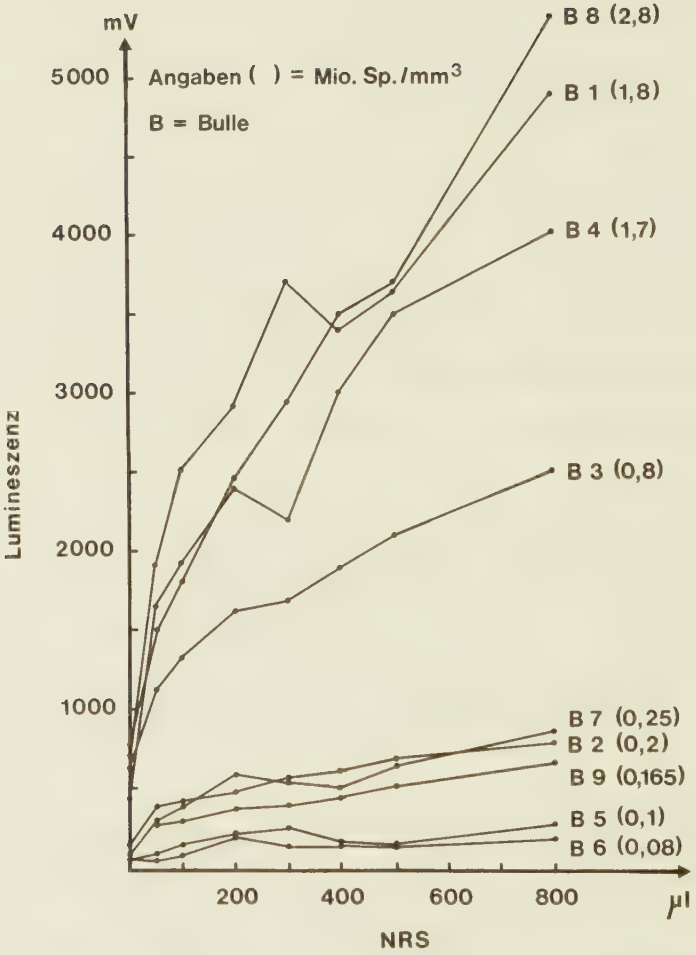


Abb. 16: Maximum der Lumineszenz von Bullenspermien bei steigenden NRS – Konzentrationen

Um eine mögliche Beeinflussung des Luciferin-Luciferasesystems durch das Detergens NRS festzustellen, wurde eine Lösung mit konstantem ATP-Gehalt (Reinsubstanz) mit und ohne NRS gemessen. Es wurden die Lichtsignale von 10 µl einer 1 x 10^{-5} molaren ATP-Lösung unter Zugabe von 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 800 µl NRS bestimmt.

Durch NRS-Zugabe konnte auch die Lumineszenz einer ATP-Reinsubstanz gesteigert werden (Abb. 17). Der Lichtemissionswert einer mit 800 µl NRS gemessenen ATP-Lösung verdoppelte sich gegenüber einer Nucleotidbestimmung der gleichen Lösung ohne NRS.

Bei derselben Versuchsanordnung wurde jedoch in Sperma hoher Dichte eine Erhöhung bis zum zehnfachen der ohne NRS gefundenen Werte erreicht.

Durch diese Untersuchungen war denkbar geworden, daß Wechselwirkungen zwischen NRS und Spermabestandteilen zu einer verbesserten Reaktionsfähigkeit der Biolumineszenzreagenzien führte. Nicht ein Zellwandaufschluß mit dem dadurch bewirkten mehr an ATP, sondern eine Milieuveränderung mit einer Stimulierung der Luciferin-Luciferase würde dann die Erhöhung der Lichtemission bedingen.

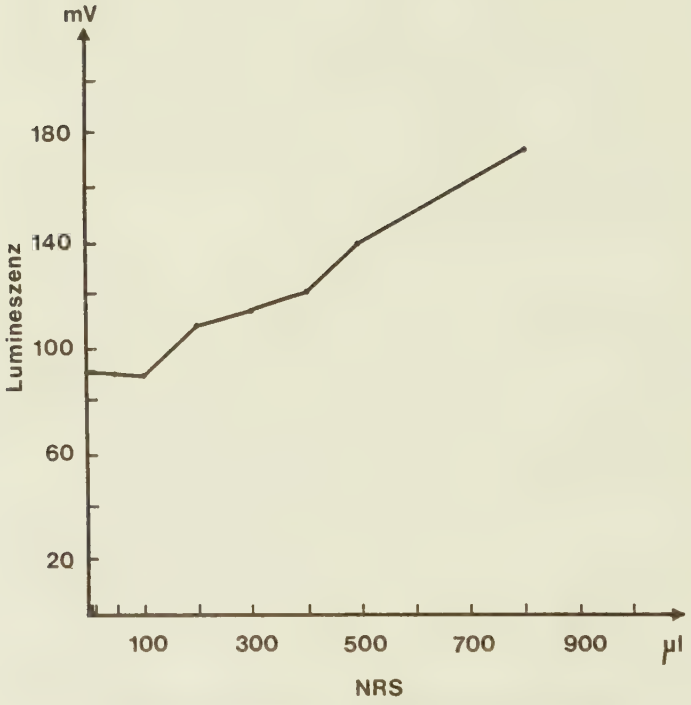


Abb. 17 : Lichtsignal einer ATP - Lösung mit konstantem Inhalt bei steigender NRS - Zugabe

Um diese Möglichkeit abzuklären, wurde auf das Verfahren der Internen Standardisierung zurückgegriffen. Läßt NRS das Reaktionsvermögen der Lumineszenzflüs-

sigkeit unverändert, müßte bei steigender Detergenskonzentration die Erhöhung der Lichtemission durch das von außen zugeführte ATP gleich bleiben. Führte NRS jedoch zu einer Stimulation, würden gleiche ATP-Mengen einen unterschiedlichen Lichtoutput ergeben.

Es wurde die Zugabe von 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 800 µl NRS getestet. War das Lumineszenzmaximum der Spermaprobe erreicht, wurde die ATP-Standardlösung zupipettiert und der daraus resultierende Anstieg der Lichtemission registriert.

Es war zu erkennen, daß trotz zunehmender Lumineszenz des Spermas bei steigendem NRS-Anteil die Emissionserhöhung durch den Internen Standard gleich blieb (Abb. 18).

3.2.2.2.2. Die Kinetik einer ATP-Messung in nativem Sperma mit NRS

Es sollte die Kinetik einer ATP-Verlaufsmessung in mit NRS versetztem Sperma während einer Biolumineszenzreaktion aufgezeichnet werden.

Ansatz:

(1.) 200 µl + 800 µl (NRS + Puffer) + 10 µl Sperma

(2.) + 10 µl 10^{-5} mol ATP-Standard; wurde zugegeben, nachdem das Lumineszenzmaximum des Spermas erreicht war

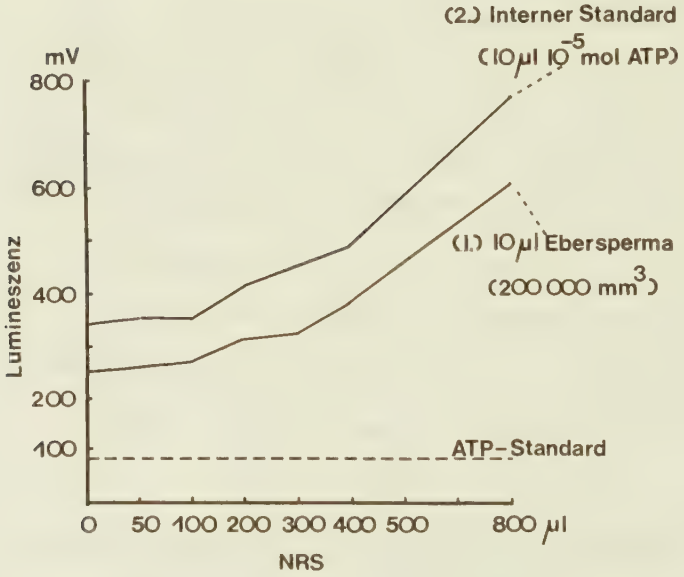


Abb. 18: Die Lichtemission einer Eberspermaprobe bei steigender NRS-Zugabe, (1. Kurve) mit interner Standardisierung (2. Kurve)

Testansatz:

200 µl AMR + 300 µl Puffer + 500 µl NRS + 10 µl Sperma

Zehn Mikroliter Bullensperma wurden in eine Küvette mit 200 µl AMR, 300 µl Puffer und 500 µl NRS pipettiert. Anschließend wurde das ATP der Probe in Sekundenabständen aufgezeichnet.

Bei der Messung der Spermaproben mit NRS konnte ein anfänglicher Lumineszenzanstieg gesehen werden, der nach 16 Sekunden in ein Maximum mündete, etwa 2 Sekunden gleich blieb und dann steil abfiel (Abb. 19). Eine Minute nach Beginn der Lumineszenzreaktion war ATP um die Hälfte reduziert. Es näherte sich dann im weiteren Verlauf asymptotisch dem Null-Wert.

Ein Vergleich zeigte die Ähnlichkeit des ATP-Kurvenverlaufs einer nativen Spermaprobe eines Bullen, die mit und ohne NRS untersucht worden war. Das Lichtemissionsmaximum des Spermas mit NRS lag über dem der ohne NRS gemessenen Probe. Anstieg und Abfall verhielten sich fast synchron. Die höchste Lumineszenz erbrachte das erhitzte Ejakulat. Sein Maximum lag noch über dem der Probe mit NRS. Auch blieb sein Lichtsignal konstant.

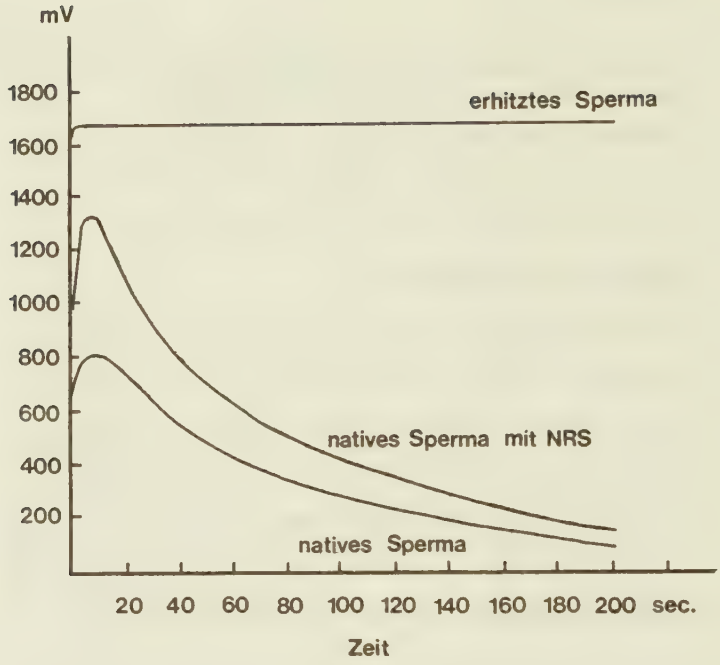


Abb. 19: Vergleich der Reaktionskinetik von Bullensperma, dessen ATP-Gehalt nativ, mit NRS und erhitzt gemessen wurde

In erhitztem Bullensperma war die Lichtemission mit und ohne NRS gleich.

3.2.2.2.3. Verhältnis NRS : Zellzahl

Es sollte überprüft werden, ob ein Optimum im Verhältnis zwischen einer NRS-Menge und einer bestimmten Spermienzahl besteht. Die Möglichkeit einer Erschöpfung des NRS durch hohe Zellzahlen sollte abgeklärt werden.

Dazu wurden Spermaverdünnungsreihen angelegt. Ejakulate mit einer durchschnittlichen Dichte von einer Million Spermien/µl wurden mit CUE-Tris-Puffer auf 500 000, 250 000, 125 000, 62 500, 31 250, 15 625 und 7 812 Spermien/µl verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wurde unter Zugabe von 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 800 µl NRS auf ihr meßbares ATP überprüft.

Bei hohen Zellkonzentrationen von einigen hunderttausend Spermien pro µl stieg die Lumineszenz einer Probe prozentual dem NRS im Meßvolumen an. Bei einer Zahl von ca. 60 000 Spermien/µl genügten 200 µl NRS, um das Maximum an ATP freizusetzen (Abb. 20). Ab ca. 30 000 Sp./µl - dies bedeutet bei der Messung 10 µl 300 000 Zellen in einem Milliliter Lumineszenzansatz - war mit 100 µl NRS ein Lichtemissionswert erreicht, der durch zusätzliche Detergensver-

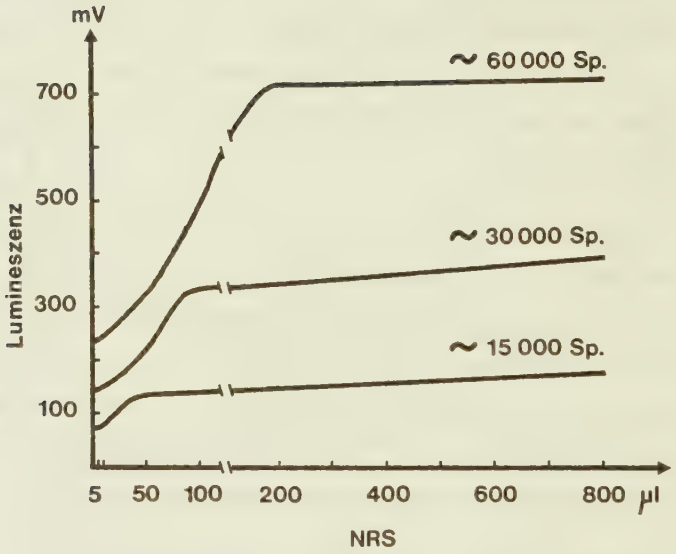


Abb. 20: Lumineszenz von Ejakulaten, die auf 60-, 30- und 15-Tsd. Spermien/mm³ verdünnt waren, bei steigender NRS-Zugabe

abreichung kaum mehr gesteigert werden konnte. Bei der Verdünnungsstufe von circa 15 000 Sp./µl - dies waren 150 000 Spermien im Biolumineszenzansatz - ge-

nügten 50 µl NRS um alle Zellwände aufzuschließen und um alles ATP freizusetzen.

3.2.2.2.4. Reproduzierbarkeit der mit NRS gemessenen Werte.

Bei der Messung von 10 µl eines Bullenejakulates mit einer Dichte von 500 000 Sp./µl und 100 µl zugesetztem NRS ergab sich eine Streuung von 105,75 mV um den Mittelwert von 1073,8 und ein Variationskoeffizient von 9,85 % (Tab. 5).

3.2.3. Die Messung von ADP

3.2.3.1. Umwandlung von ADP in ATP

Luciferin-Luciferase ist spezifisch für Adenosintriphosphat (WHITEHEAD et al., 1979). ADP ist nicht in der Lage die Biolumineszenzreagenzien zu einer Lichtemission anzuregen. Vor einer Messung muß ADP deshalb in ATP verwandelt werden.

Tab. 5 : Reproduzierbarkeit der Biolumineszenzmessung eines Bullenejakulates mit NRS

Biolumineszenz-messung von:	Lumineszenz in mV
10 µl eines Bullen-ejakulates mit einer Dichte von 500 000 Sp./mm^3, versetzt mit 100 µl NRS	1004 1183 1066 941 1175
$\bar{x}$	1073,8
$s^{\pm}$	105,75
VK %	9,85

Meßmodus:

700 µl Puffer + 200 µl AMR + 100 µl NRS + 1 µl Sperma (nativ)

Das Enzym Pyruvatkinase (PK) synthetisiert in Anwesenheit des Phosphatlieferanten Phosphoenolpyruvat ATP aus ADP. Zur Entfaltung der vollen katalytischen Wirkung benötigt das Enzym Mg- und K-Ionen. Die Umwandlungsgleichung lautet (Kap. 2.2.6.):

$$ADP + PEP \xleftrightarrow[Mg^{++}\ K^{+}]{PK} ATP + Pyruvat$$

3.2.3.2. Ansatz zur ADP-Messung

Um geeignete Reaktionsbedingungen für die Pyruvatkinase zu schaffen, wurde der als Milieu für die ATP-Bestimmung verwendete Tris-EDTA-Puffer durch den Mg- und K-ionenhaltigen Tris-H_2SO_4-Puffer ersetzt.

Um das von LUNDIN et al.(1976) sowie HOLM-HANSEN und KARL (1978) beschriebene Verfahren zum Nachweis von ADP mit der Biolumineszenz an Reinsubstanzen nachzuvollziehen, wurde folgender Testansatz durchgeführt:

200 µl AMR + 800 µl Tris-H_2SO_4 Puffer
+ 10 µl 1 mM PEP
+ 1 µl ($1x10^{-5}$ M ATP + $1x10^{-5}$M ADP)
+ 5 µl PK (20 Sek. nach Meßbeginn)

Den Biolumineszenzreagenzien,bestehend aus Puffer, AMR und Phosphoenolpyruvat, wurde ein Mikroliter eines Gemisches aus ATP-, ADP-Reinsubstanzen zupipettiert.

Danach konnte eine Lumineszenz von 70 mV registriert werden (Abb. 21). Sie erreichte sofort nach Meßbeginn ihr Maximum und blieb konstant. Nach der Aufzeichnung des ATP-bedingten Lichtsignals der Probe wurden etwa 20 Sekunden nach Meßbeginn 5 µl Pyruvatkinase in die Meßküvette gegeben. Daraus resultierte ein allmählicher Lumineszenzanstieg, der nach etwa einer Minute ein Maximum erreichte. Diese Zeit benötigte die Pyruvatkinase, um ADP in ATP zu verwandeln.

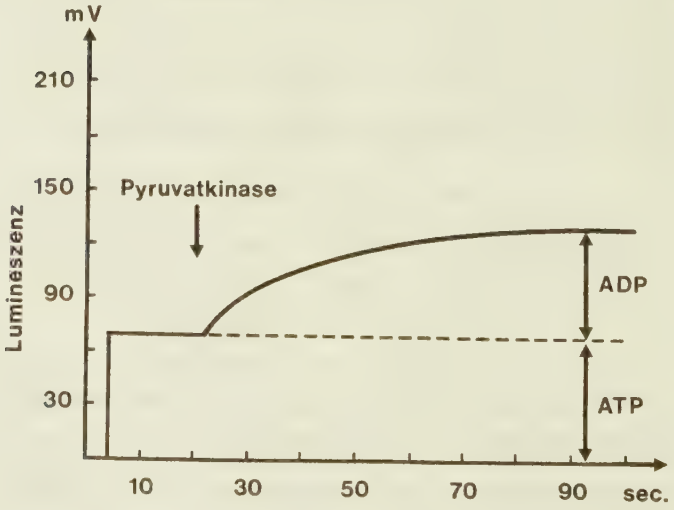


Abb. 21 : Biolumineszenzmessung von ATP - ADP - Reinsubstanzen

3.2.3.3. Die Bestimmung von ADP in nativem Sperma

Bei der Erprobung einer ADP-Bestimmung an Reinsubstanzen wurde die Pyruvatkinase 20 Sekunden nach Meßbeginn zugegeben.

Wurde gleichermaßen in nativem Sperma verfahren, erbrachte die Pyruvatkinase nur eine geringe Lumineszenzerhöhung (Abb. 22). Die Lichtemission stieg von 60 auf 70 mV und fiel im weiteren Verlauf ab. Der höchste Wert nach Pyruvatzugabe erreichte nicht mehr die Ausgangswerte. ADP wurde zu einem Zeitpunkt bestimmt, zu dem ATP gegenüber den Anfangswerten schon deutlich abgefallen war.

Wie aus dem Kurvenverlauf einer ATP-Messung in nativem Bullensperma bekannt ist (Abb. 8), wird in den ersten Sekunden nach Reaktionsbeginn das Lumineszenz-

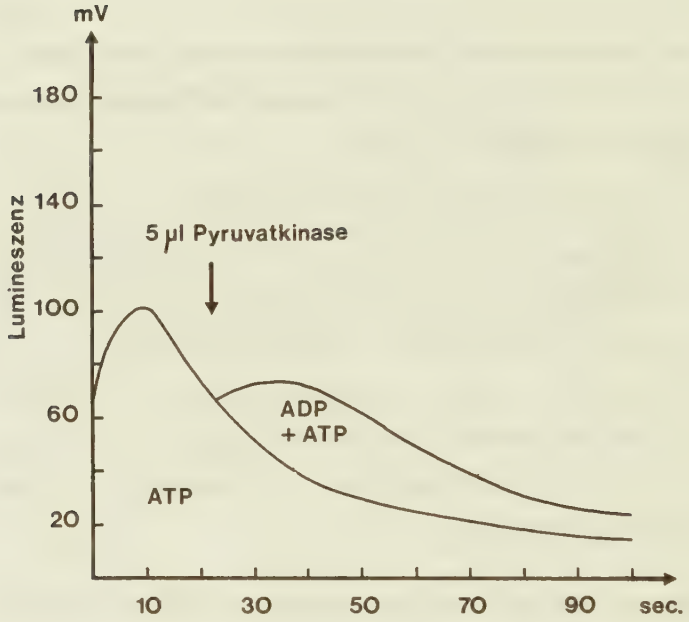


Abb. 22: Die ATP- und ADP-Bestimmung im nativen Bullensperma (Zugabe der Pyruvatkinase nach 20 Sekunden)

maximum erreicht, das nach 20 Sekunden deutlich verringert ist. Der für ATP beobachtete Schwund im Verlauf einer Biolumineszenzreaktion wurde gleichermaßen für ADP vermutet.

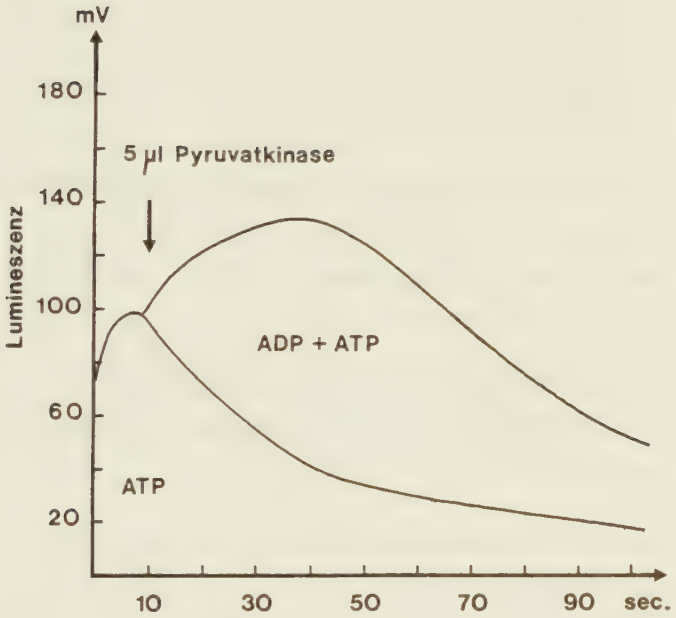


Abb. 23 : Die ATP - und ADP - Bestimmung in nativem Bullensperma (Zugabe der Pyruvatkinase nach Erreichen des ATP - Maximums)

Deshalb wurde abweichend von dem Vorgehen mit Nucleotidreinsubstanzen die Pyruvatkinase früher zugesetzt. Dies geschah jetzt sofort nach Erreichen des ATP-peaks.

Die Pyruvatkinase konnte nun die Lichtemission deutlich über den Anfangswert hinaus anheben. Das neue ADP-bedingte Plateau wird nicht sofort erreicht, sondern erst nach etwa 40 Sekunden.

Die träge katalytische Wirkung der Pyruvatkinase war schon bei ihrer Erprobung an Reinsubstanzen zu erkennen (Kap. 3.2.3.2.) und wurde nun auch bei der Messung von Sperma gefunden.

Ein Versuch,die ADP-Umwandlung durch eine Konzentrationssteigerung der Reaktionspartner zu erhöhen, schlug fehl.

Da nach Reaktionsbeginn bis zu einer maximalen Umwandlung von ADP fast eine Minute verging, war zu vermuten, daß ein Großteil der Nucleotide abgebaut und für eine Messung nicht mehr zur Verfügung stand. Um die Zeit für einen eventuellen Nucleotidschwund bei der Biolumineszenzmessung von nativem Sperma weiter zu verkürzen, wurde folgende Versuchanordnung

gewählt: Schon vor dem Beginn der Reaktion mit einer nativen Spermaprobe wurde dem Lumineszenzgemisch 5 µl Pyruvatkinase zugegeben. Damit begann gleichzeitig mit dem Auslösen der Luciferin-Luciferase-reaktion durch das ATP der Spermien die Umwandlung deren ADP zu ATP. Das jetzt ermittelte Lumineszenzmaximum war das Ergebnis aus der Addition beider Nucleotide (Abb. 24/I). ATP und ADP wurden während der Messung nicht mehr getrennt registriert, sondern summierten sich zu einem Lichtsignal. Um weiterhin beide Nucleotide separat erfassen zu können, waren deshalb Messungen zweier Proben desselben Ejakulats notwendig geworden. In dem ersten Ansatz wurde ATP und in einem zweiten die Summe aus ATP und ADP festgestellt. Aus der Differenz beider Kurvenmaxima ergab sich der ADP-Gehalt einer Probe (Abb. 24).

$$\text{Lichtemission für ADP} = \frac{\text{Lichtemission von Ansatz I}}{\text{Lichtemission von Ansatz II}}$$

In Ansatz I wurde vor der Spermazugabe Pyruvatkinase dem Puffer-Luciferin-Luciferase-PEP-Gemisch zugesetzt.

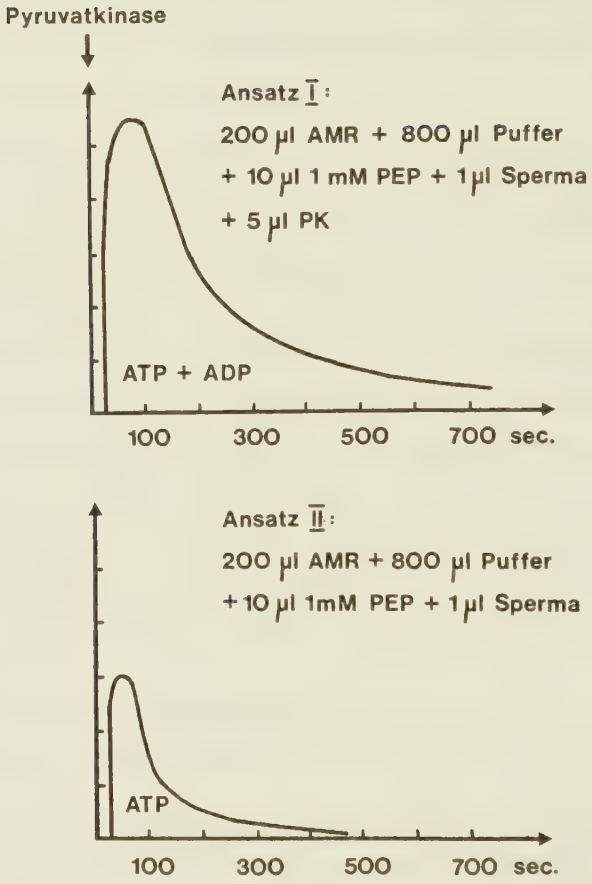


Abb. 24 : Die ATP- und ADP-Bestimmung im nativen Bullensperma durch zweimalige Messung

3.2.3.4. Die Bestimmung von ADP in erhitzem Sperma

Von erhitztem Bullensperma wurde ein Mikroliter in die Biolumineszenzreagenzien pipettiert und die Lumineszenz gemessen. Zwanzig Sekunden nach Meßbeginn wurden 5 µl Pyruvatkinase zugegeben. Darauf stieg die Lumineszenz weiter an und erreichte nach etwa einer Minute ein erneutes Maximum. Es war das Ergebnis der Umwandlung von ADP in ATP und dessen Addition zum Primär-ATP. ADP konnte aus der Differenz beider Maxima errechnet werden (Abb. 25).

3.2.4. Die Messung von AMP

3.2.4.1. Umwandlung von AMP in ATP

Luciferin-Luciferase ist spezifisch für ATP (WHITEHEAD et al., 1979). AMP ist nicht in der Lage, eine Lumineszenz zu bewirken. Deshalb muß AMP vor seiner Messung in ADP und weiter in ATP verwandelt werden (Kap. 2.2.6.).

Ansatz:

200 µl AMR + 800 µl Puffer + 10 µl 1mM PEP

+ 1 µl Sperma (erhitzt)

+ 5 µl PK

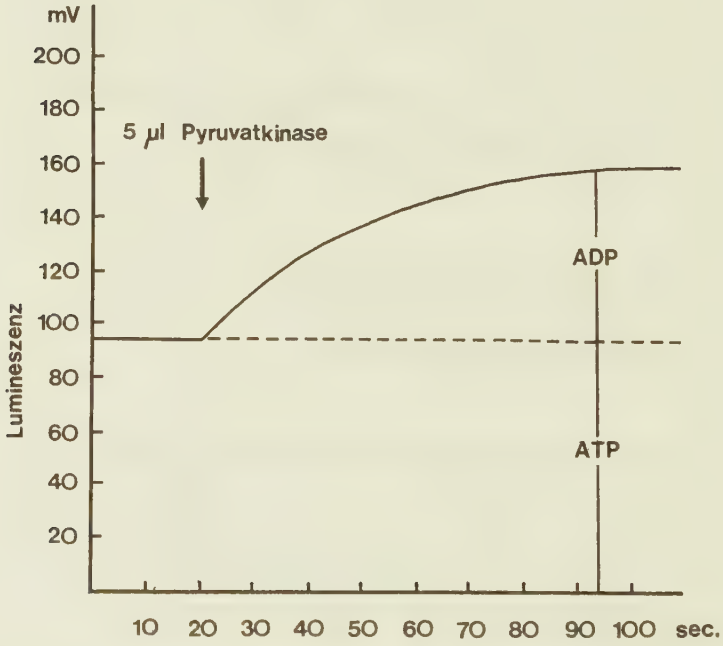


Abb. 25 : Die ATP-, ADP-Bestimmung in einem erhitzten Bullensperma

AMP wird von dem Enzym Myokinase (MK) zu ADP phosphoryliert. Die dazu nötige Energie wird aus Adenosintriphosphat gewonnen. Das entstandene ADP wird durch die Pyruvatkinase weiter in ATP verwandelt. Die Gesamtreaktion lautet:

$$\text{AMP} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{MK}} 2\ \text{ADP}$$

$$2\ \text{ADP} + 2\ \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} 2\ \text{ATP} + 2\ \text{Pyruvat}$$

3.2.4.2. Ansatz zur AMP-Messung

Die Myokinase benötigt zur vollen Aktivitätsentfaltung Mg-Ionen. Es wurde deshalb der schon bei der ADP-Bestimmung verwendete Tris-H_2SO_4 Puffer eingesetzt.

Zunächst wurde das von LUNDIN (1976) sowie HOLM-HANSEN und KARL (1978) beschriebene Verfahren zum Nachweis von ATP, ADP und AMP an Reinsubstanzen nachvollzogen.

Testansatz:

200 µl AMP + 800 µl Puffer + 10 µl 1 mM PEP
+ 1 µl ($1x10^{-5}$ M ATP + $1x10^{-5}$ M ADP + $1x10^{-5}$ M AMP)
+ 5 µl PK (20 Sek. nach Meßbeginn)
+ 5 µl MK (70 Sek. nach Meßbeginn)

Nach der Ermittlung des ATP- und danach des ADP-Gehaltes der Lösung wurden 5 µl MK zur AMP-Bestimmung zupipettiert.

Bei den Versuchen an Nucleotidreinsubstanzen zeigte die Myokinase eine schwache katalytische Wirkung. Der Umsatz von AMP zu ATP dauerte einige Minuten (Abb. 26).

3.2.4.3. Die Bestimmung von AMP in erhitzem Sperma

Die Reaktionskinetik der Myokinase verläuft sehr langsam. Dies wurde bei ihrer Erprobung an Reinsubstanzen deutlich (Kap. 3.2.4.2.).

Schon bei der Synthese von ADP zu ATP durch die Pyruvatkinase mit ihrer im Vergleich zur Myokinase vielfach schnelleren katalytischen Wirkung zeigten sich Probleme. Diese lagen in dem bereits vor einer

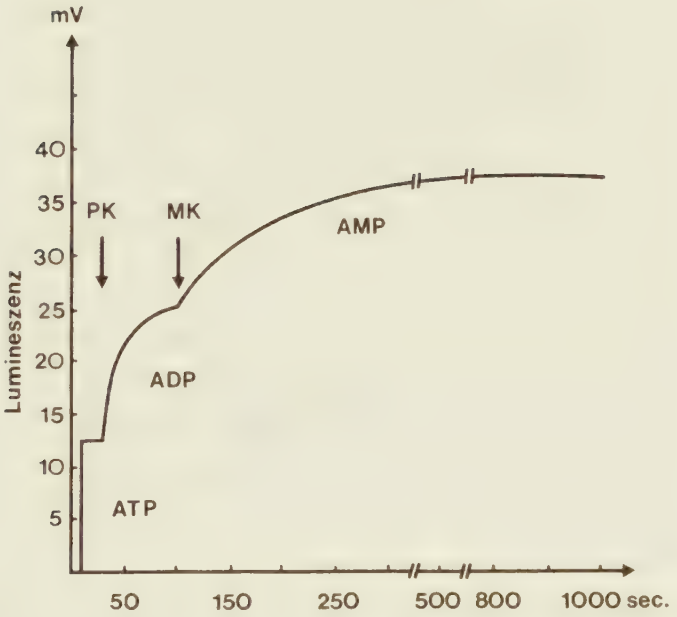


Abb. 26 : Die Biolumineszenzmessung von ATP-, ADP- und AMP-Reinsubstanzen

vollständigen ADP-Erfassung stattfindenden Nucleotidabbau. Dabei entstanden Überlagerungen, die ein Ergebnis verfälschen können (Kapitel 3.2.3.3.). Bei der verzögerten Katalyse der Myokinase war ihre volle Wirksamkeit zu einem Zeitpunkt zu erwarten, an dem der größte Teil des AMP aus der nativen Spermaprobe verschwunden war. Einige Versuche zeigten auch, daß nach der Ermittlung des ATP und ADP einer Spermaprobe die Myokinase zu keiner Lumineszenzsteigerung führte. AMP war mehrere Minuten nach Biolumineszenzbeginn nicht mehr nachweisbar.

In Anbetracht der ATP-, ADP- und AMP-abbauenden Enzyme, die eine AMP-Bestimmung in nativem Sperma unmöglich machten, wurde an deren Inaktivierung gedacht. Dies konnte durch schnelles Erhitzen des Ejakulats auf 100°C erreicht werden (Kap. 3.2.2.1.).

Durch eine Denaturierung der Nucleotidasen fielen die ATP-Werte nach Erreichen des Maximums nicht mehr ab,

sondern blieben über Minuten nahezu konstant. Eine Überlagerung der Myokinasereaktion war dadurch ähnlich wie bei der Pyruvatkinase zu vermeiden.

Testansatz:

200 µl AMR + 800 µl Puffer + 10 µl 1 mM PEP
+ 1 µl Sperma (erhitzt)
+ 5 µl PK (20 Sek. nach Meßbeginn)
+ 5 µl MK (70 Sek. nach Meßbeginn)

Das Reagenzgemisch bestehend aus Luciferin-Luciferase, Puffer, Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase und Myokinase wurde zuerst auf eine etwaige Eigenlumineszenz untersucht. Ein Gemisch, das aus in obigem Testansatz genannten Mengenverhältnissen zusammengesetzt war, zeigte eine erhebliche Lichtemission. Sie betrug kurz nach Beginn der Messung durchschnittlich 18 mV und stieg innerhalb fünfzehn Minuten auf 40 mV an (Abb. 27). Dies entsprach der Lumineszenz von $6x10^{-11}$ M ATP in einem Meßansatz. Dieser durchschnittliche Background der Myokinase variierte sehr stark. Er schwankte zwischen 15 und 60 mV.

Die Eigenlumineszenz der Myokinase erforderte vor jeder AMP-Messung eine Backgroundbestimmung des Biolumineszenzansatzes einschließlich der Myokinase.

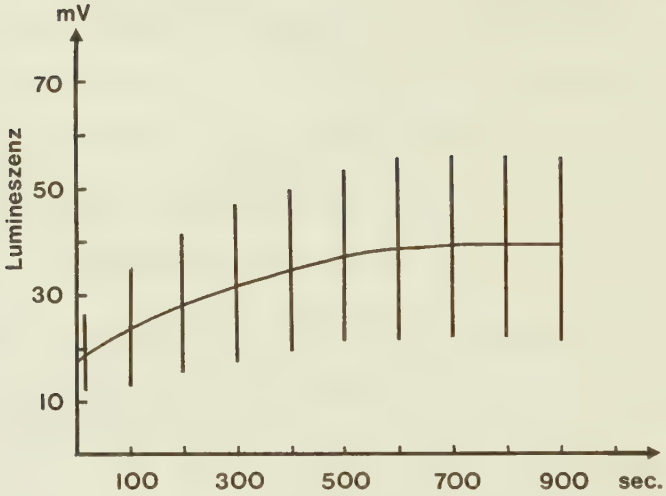


Abb. 27: Backgroundlumineszenz der Meßreagenzien nach Zusatz von 5 µl Myokinase

Da der Background erst nach fünfzehn Minuten gemeinsamer Vorreaktionszeit von Puffer, AMR, PEP, Pyruvatkinase und Myokinase auf einem konstanten Lumineszenzniveau blieb, konnte frühestens danach eine AMP-Messung durchgeführt werden. Wurde eine Probe in ein

Biolumineszenzgemisch nach dessen Vorreaktionszeit pipettiert, war die registrierte Lichtemission die Summe aus der Lumineszenz der Nucleotide einer Probe und dem Background des Biolumineszenz-Myokinase-Ansatzes.

In einem Versuch, bei dem nach der ATP- und ADP-Bestimmung einer erhitzten Spermaprobe dem Reaktionsgemisch 5 µl Myokinase zugegeben wurde, fiel die Lumineszenz sofort stark ab (Abb. 28). Sie stieg dann im weiteren Verlauf der Messung wieder langsam an, um etwa 15 Minuten nach dem Myokinasezusatz ein erneutes Maximum zu erreichen. Dieses lag nur gering über dem gemeinsamen Wert aus ATP und ADP.

Wurde jedoch nach 15 minütiger gemeinsamer Vorreaktion von AMR, Puffer, PEP, PK und MK die erhitzte Spermaprobe hinzugefügt, lag das Lumineszenzmaximum wesentlich über dem der obigen Versuchsanordnung.

Die durch die Besonderheiten der Myokinase notwendig gewordene Vorreaktionszeit der Biolumineszenzreagenzien zur AMP-Bestimmung machte eine getrennte Ermittlung von ATP, ADP und AMP während einer Messung unmöglich. Durch die Anwesenheit der Enzyme

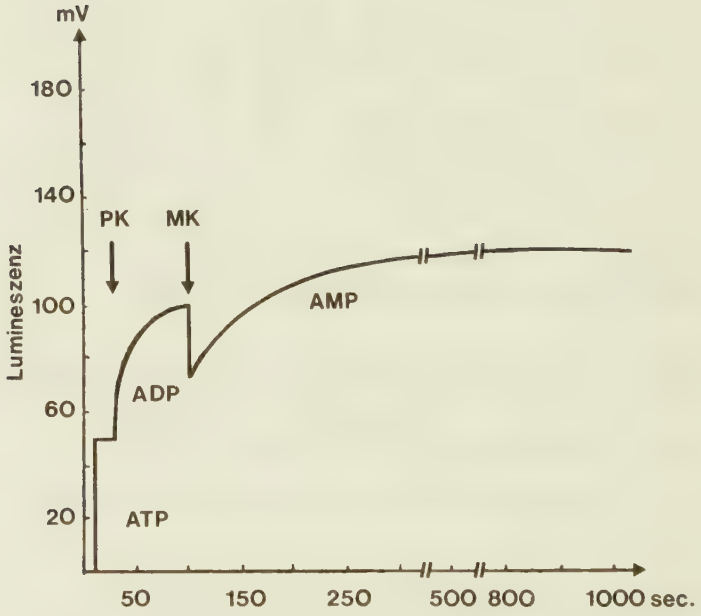


Abb. 28: Lumineszenzabfall einer Nucleotidmessung nach Myokinasezugabe

Pyruvatkinase und Myokinase von Beginn einer Nucleotidbestimmung an erfolgte sofort, nachdem die Spermaprobe in die Meßküvette pipettiert war, eine Umwandlung von AMP und ADP in ATP. Die erhaltene Lichtemission war dann ein Resultat aus der Addition aller drei Nucleotide. Diese Fakten erforderten die Messung zweier Proben desselben Ejakulates zur Feststellung: 1. des ATP- und ADP-Gehaltes
2. der Summe aus Background, ATP, ADP und AMP

I. Testansatz:

200 µl AMR + 800 µl Puffer + 10 µl 1 mM PEP
+ 1 µl Sperma (erhitzt)
+ 5 µl PK (nach Registrierung von ATP)

II. Testansatz:

200 µl AMR + 800 µl Puffer + 10 µl 1 mM PEP
+ 5 µl PK + 5 µl MK
+ 1 µl Sperma (Zugabe nach 15 min. Vorreaktionszeit der Biolumineszenzreagenzien)

Im ersten Ansatz wurde nach der ATP-Bestimmung zur ADP-Ermittlung Pyruvatkinase zugegeben.

Im zweiten Ansatz wurde nach einer fünfzehnminütigen Vorreaktionszeit aller Reagenzien deren Backgroundlumineszenz gemessen. Danach wurde ein µl des erhitzten Spermas zugemischt und damit ATP, ADP und AMP gemeinsam registriert. Durch Substraktion der Lichtemission beider Ansätze und unter Berücksichtigung des Backgrounds ist auf AMP wie folgt zu schließen:

AMP = Ansatz II (ATP + ADP + AMP + Background)
- Ansatz I (ATP + ADP)
- Background von Ansatz II vor Spermazugabe

Beispiel einer AMP-Messung in erhitztem Bullensperma (Abb. 29):

Die Zugabe von einem Mikroliter erhitzen Bullensperma zu Testansatz I führte zu einer Lichtemission von 100 mV. Nachdem 5 µl Pyruvatkinase zupipettiert worden waren, erhöhte sich die Lumineszenz auf 200 mV. In einem zweiten Testansatz wurde nach einer Vorreaktionszeit des Biolumineszenzgemisches mit Myokinase von 15 Minuten die Eigenlumineszenz gemessen. Sie betrug 30 mV. Dann wurde ein µl Sperma hinzugemischt. Die Lumineszenz stieg innerhalb 15 Minuten auf 300 mV.

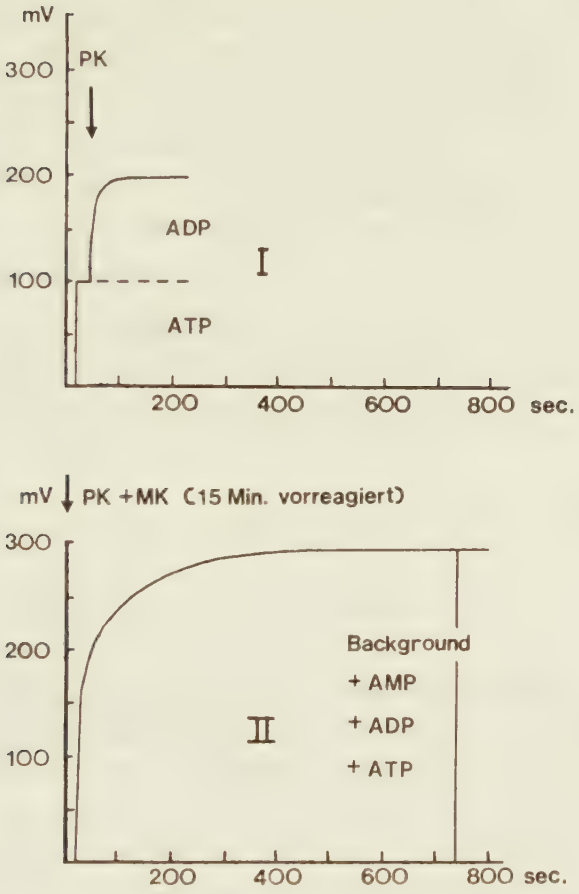


Abb. 29 : Die AMP – Bestimmung in Sperma durch zwei getrennte Messungen desselben Ejakulates

Daraus ergibt sich für ATP und ADP je eine Lumineszenz von 100 mV (Ansatz I). Werden im Ansatz II von der Gesamtlumineszenz von 300 mV die Backgroundlumineszenz von 30 mV und die Lichtemission von ATP und ADP in Höhe von je 100 mV subtrahiert, bleibt für AMP ein Wert von 70 mV.

3.3. Die Anwendung der Adenosinnucleotidbestimmung mit der Biolumineszenz bei spermatologischen Fragestellungen

3.3.1. Methodisches Vorgehen

3.3.1.1. Die Trennung von Spermien und Plasma

Zur Herkunftsbestimmung der ATPasen im Bullenejakulat wurden Spermien und Seminalplasma durch Zentrifugieren voneinander getrennt.

5 Milliliter einer Spermaprobe wurden bei 6000 U/min. zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und dies insgesamt viermal wiederholt. Um fünf ml Sperma zur Verfügung zu haben, mußten zwei

hintereinander gewonnene Ejakulate eines Tieres gemischt werden. Nach dem Zentrifugieren wurde mikroskopisch die Motilität der 1 : 100 in CUE-Tris-Verdünner resuspendierten Spermien bestimmt und überprüft, daß das Plasma spermienfrei war. War ein Erhitzen einer der beiden Fraktionen erforderlich, geschah dies nach dem beschriebenen Verfahren (3.2.2.1.5.). Um den Einfluß von erhitztem und unbehandeltem Seminalplasma auf den ATP-Gehalt von Bullenspermien zu demonstrieren, wurden je 10 µl durch Vermischen von Samenplasma mit resuspendierten Spermien untersucht.

3.3.1.2. Die Erstellung von Verdünnermedien

Zur Überprüfung des Einflusses verschiedener Glyzerinkonzentrationen auf die Adenosinnucleotide in Bullensperma während des Tiefgefrierens und nach dem Auftauen wurden die Samenzellen im Tris-Verdünner nach FOOTE et al. (1960) suspendiert. Der für die Herstellung der beiden Verdünner (I und II) verwendete Ausgangspuffer setzt sich zusammen aus:

6,056 g Trishydroxymethylaminomethan
3,4 g Zitronensäure
2,5 g Fruktose
176,0 ml Aqua dest.

Nach dem Aufkochen und Abkühlen auf + 20°C wurde eine Hälfte des Puffers (= 88 ml) mit 25 ml Eidotter und 12 ml Aqua dest. zum Verdünner I vermischt. Die andere Hälfte bildete mit ebenfalls 25 ml Eidotter und Glyzerin den Verdünner II. Die Glyzerinmenge im Verdünner II richtete sich nach der in der Endverdünnung erwünschten Konzentration. Diese wurde nach folgenden Formeln berechnet:

(A) Glyz.konz. in Verd. II (Vol.%) =

$$\frac{\text{erwünschte Glyz.konz. (Vol. \%) in Endverdünnung} \times \left(\text{Puffer(ml)} + \text{Sperma(ml)}^*\right)}{\text{Puffer (ml)}^*}$$

Die eigentliche Glyzerinmenge, die dem Verdünner II zugesetzt werden mußte, um eine bestimmte Glyzerinkonzentration zu erzielen, errechnete sich nach folgender Formel:

*Das Volumen des Puffers richtete sich nach der erwünschten Spermaverdünnung.

$$(B)\quad \text{Glyz.menge i. Verd. II (ml)} = \frac{\left(\text{Puffer(ml)} + \text{Eidot.(ml)} + \text{Glyz.(ml)}\right) \times \text{Glyz.konz.i.Verd.II(Vol.\%)}}{100}$$

Beispiel:

Ein mit Verdünner I vermischtes Sperma soll mit Verdünner II 1 : 10 verdünnt werden und auf eine Glyzerinendkonzentration von 12 % eingestellt werden. Verdünner II besteht aus 88 ml Puffer, 25 ml Eidotter und der zu errechnenden Glyzerinmenge.

$$(A)\quad x = \frac{12 \times (10 + 1)}{10} = 13{,}2\ \%$$

$$(B)\quad x = \frac{(88 + 25 + x) \times 13{,}2}{100} =$$

$$= 17{,}18\ \text{ml};$$

Ergebnis: Verdünner II setzt sich zusammen aus 17,18 ml Glyzerin, 88 ml Puffer und 25 ml Eidotter. Bei einem Verhältnis von 10 ml Verdünner II zu 1 ml Sperma ergibt sich eine Endkonzentration von 12 % Glyzerin.

3.3.1.3. Das Verdünnen und Tiefgefrieren der Bullen-Spermien

Die Ejakulate wurden nach Abkühlung auf Zimmertemperatur mit Verdünner I im Verhältnis 1 : 10 vermischt. Danach wurde tropfenweise mit Verdünner II im Verhältnis 1 : 1 auf die Endkonzentrationen verdünnt. Auf diese Weise wurden Verdünnungen mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 bzw. 8,72 prozentigem Glyzerinanteil hergestellt. Von den verschiedenen Verdünnungsstufen wurden mehrere Pailletten à 0,5 ml abgefüllt.

Der Tiefgefriervorgang begann mit einer Abkühlung der Pailletten im Wasserbad von Zimmertemperatur auf + 5°C im Verlauf von 90 Minuten. Danach wurden die Spermien eine Stunde zur Adaption bei + 5°C gelagert. Anschließend wurden die Pailletten in den Hals eines Stickstoffbehälters gehängt und nach drei Minuten im flüssigen Stickstoff versenkt.

Das Auftauen erfolgte durch ein 15 sekundenlanges Eintauchen der Pailletten in 38°C warmes Wasser.

Die spätere Adenosinnucleotidmessung erfolgte bei + 20°C, + 5°C und nach dem Auftauen. Transportvek-

toren wie Pipettenspitzen oder Reagenzgläser, die bei einer Messung mit den Spermien Kontakt hatten, wurden auf diejenige Temperatur gebracht, bei der die ATP-, ADP-, bzw. AMP-Bestimmung durchgeführt werden sollte.

3.3.2. Ergebnisse

3.3.2.1. Herkunft der ATPasen im Sperma von Bullen

In spermienfreiem Seminalplasma konnte kein ATP nachgewiesen werden.

Die in CUE-Tris Puffer verdünnten Spermien beinhalteten ATP. Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied zu Nativsperma im Verlauf der ATP-Messung. Bei Nativsperma sank die Lumineszenz nach Erreichen des Maximums innerhalb zwei bis drei Minuten nach Reaktionsbeginn auf weniger als ein Drittel ab, während es bei Spermien ohne Seminalplasma über Minuten nahezu konstant blieb (Abb. 30).

Wurden Spermien und Plasma im Luciferasesystem vereint, entsprach die ATP-Verlaufsmessung wieder der eines nativen Ejakulats. Für diese Spermien wurden

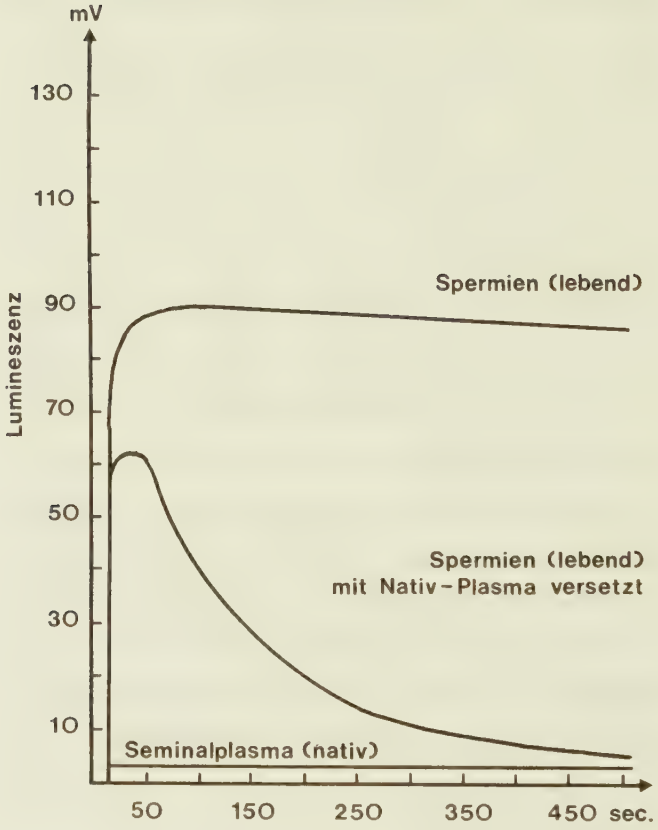


Abb. 30 : Kinetik der ATP-Bestimmung von Spermien und Seminal-plasma (durch Zentrifugieren voneinander getrennt)

jedoch geringere ATP-Gehalte ermittelt als für die gleichen in Seminalplasmafreiem Medium gemessenen.

Obwohl bei plasmafreien Spermien ein ATP-Abfall nach Meßbeginn ausblieb, vergingen bis zum Erreichen des Kurvenmaximums wie im Nativejakulat circa 30 Sekunden. Dieser kurze Anstieg bis zum Erreichen des ATP-peaks entfiel bei erhitzten Spermien. Hier wurde vom Beginn einer Messung an eine Lumineszenz registriert, die über Minuten konstant blieb. Wurde den erhitzten Spermien "Nativplasma" zugesetzt, fiel das vorher konstante Lichtsignal stark ab, um nach circa 100 Sekunden nur mehr ein Zehntel des Ausgangswertes zu betragen (Abb. 31).

Zum weiteren Beweis des Plasmanucleotidaseneinflusses sollte die gleiche Versuchsanordnung mit erhitztem Seminalplasma wiederholt werden. In erhitztem Plasma sind die ATPasen denaturiert und damit wirkungslos.

Der ATP-Verlauf von Spermien mit erhitztem Seminalplasma glich dem von seminalplasmfreien Spermien. Es war keine Wirkung des Samenplasmas zu erkennen. Der Adenosinnucleotidgehalt wies keinen Abfall auf (Abb. 31).

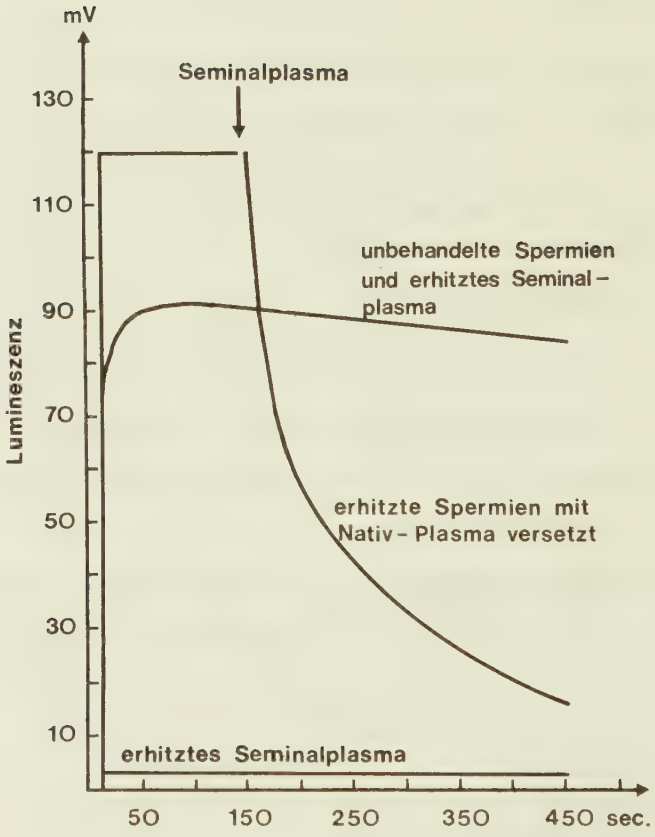


Abb. 31 : Wirkung des Erhitzens auf Spermien und Seminalplasma und deren wechselseitiger Einfluß

3.3.2.2. Vergleich zwischen der Reaktionskinetik von erhitztem und nativem Sperma einiger Spezies

Der ATP-Gehalt von Nativsperma verschiedener Tierarten und des Menschen nimmt nach Erreichen des Maximums unterschiedlich stark ab. In den dichten Ejakulaten von Bulle, Schaf- oder Ziegenbock tritt ein rascher Abfall ein, wohingegen bei der geringen Spermiendichte von Hengst, Eber oder Mann ein langsamerer Verlauf zu beobachten ist. Im nativen Sperma vom Kaninchen war kaum ATP nachweisbar (Abb. 32, 33, 34).

Wurden die Ejakulate erhitzt, war schon bei Meßbeginn eine maximale Lumineszenz erreicht, die dann mehrere Minuten nahezu konstant blieb. Die Abnahme der Lichtemission bei derart vorbehandeltem Sperma betrug bei allen Spezies nur etwa 2 - 5 % pro Minute.

Die ATP-Maxima in erhitztem und nativem Sperma unterschieden sich stark. In hitzebehandeltem Sperma des Kaninchens waren gegenüber unbehandeltem zehnfach höhere ATP-Mengen zu finden. Die geringste Differenz zwischen beiden Proben zeigten die Ejakulate von Ebern.

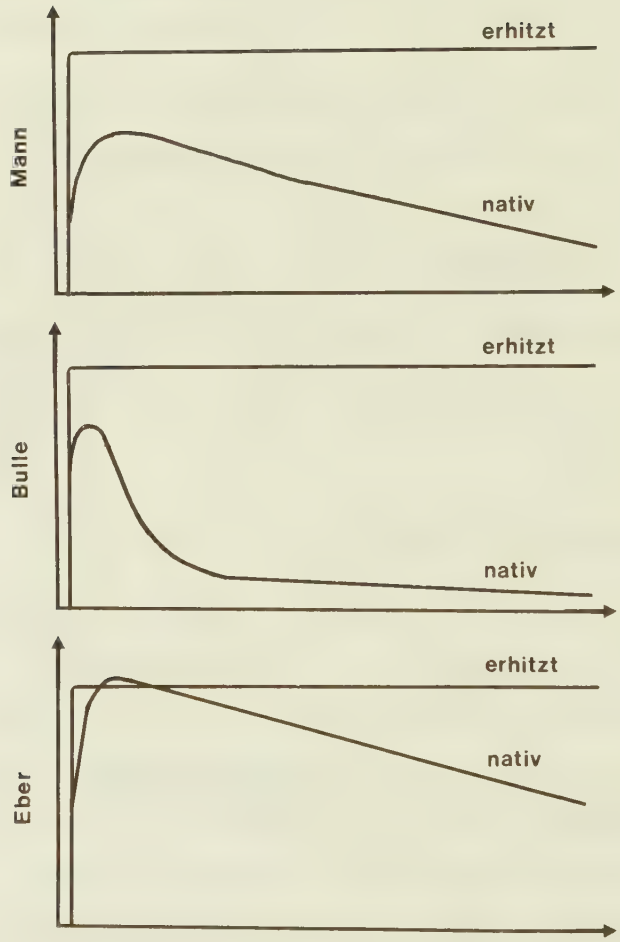


Abb. 32: Vergleich zwischen der Reaktionskinetik von erhitzten und nativen Spermaproben verschiedener Spezies

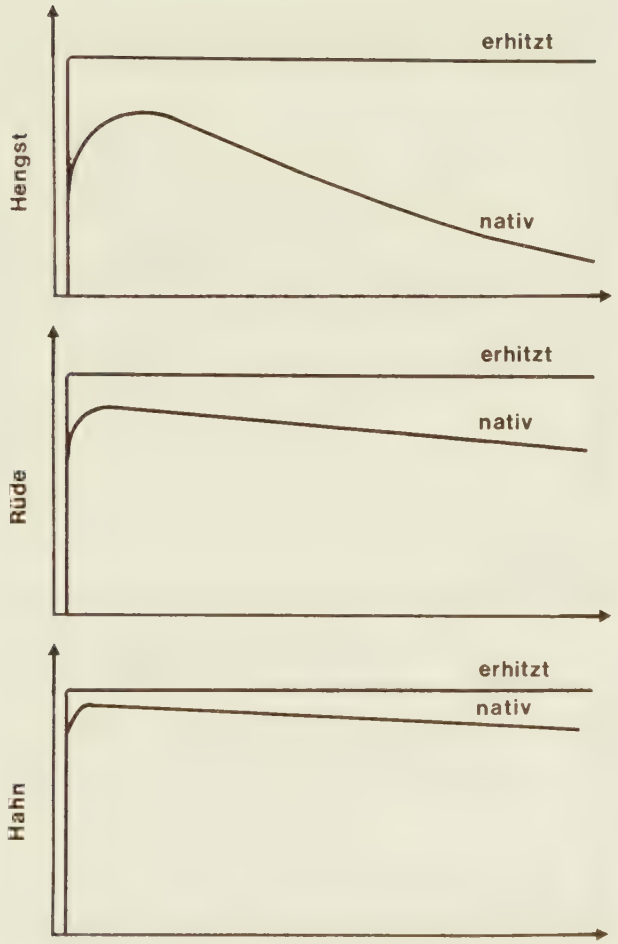


Abb. 33 : Vergleich zwischen der Reaktionskinetik von erhitzten und nativen Spermaproben verschiedener Spezies

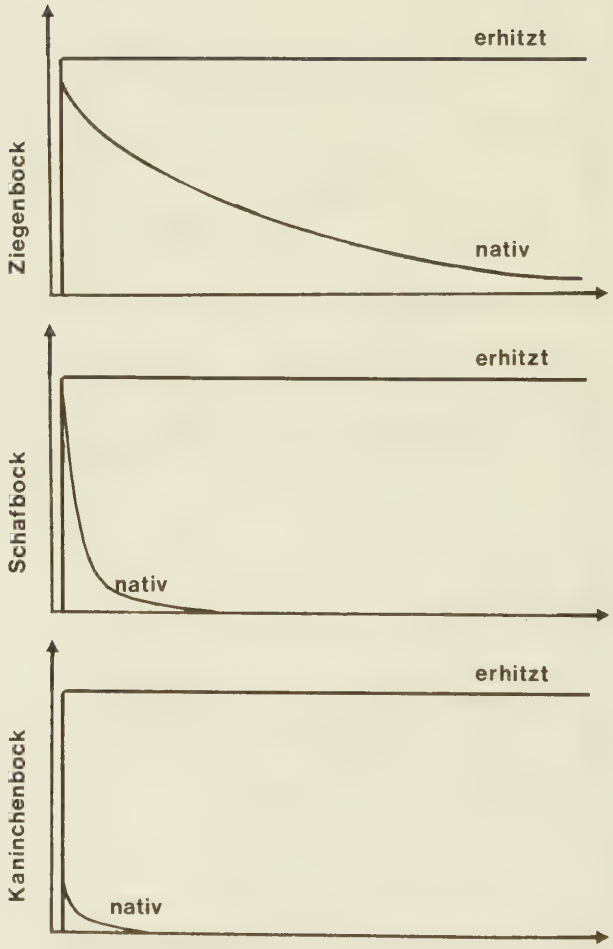


Abb. 34 : Vergleich zwischen der Reaktionskinetik von erhitzten und nativen Spermaproben verschiedener Spezies

3.3.2.3. Der durchschnittliche ATP-, ADP- und AMP-Gehalt im Sperma verschiedener Spezies

Der höchste ATP-Gehalt pro 100 Millionen Spermien konnte in Schafsperma ermittelt werden. 10^8 Samenzellen beinhalteten hier durchschnittlich 18,66 nmol ATP. Es folgten der Hund mit 15,87 nmol, Schwein und Rind mit circa 11, die Ziege mit 8,81 und das Pferd mit 6,63 nmol ATP. Im Sperma des Hahnes war mit 2,21 nmol der niedrigste ATP-Wert zu messen. Für die Spermien des Menschen wurden 15,07 nmol ATP/10^8 Spermien gemessen (Tab. 6).

Der ADP-Gehalt der Spermien war bei allen Säugetieren niedriger als der ATP-Gehalt. Es ließ sich eine ähnliche Reihenfolge vom Schaf über Rind und Schwein zum Pferd aufstellen. An letzter Stelle stand wiederum das Huhn. Im Gegensatz zu allen übrigen Spezies betrug bei dieser Tierart der ADP-Gehalt etwa das Doppelte des ATPs (Tab. 6).

Die AMP-Menge pro 10^8 Spermien lag bei allen Säugern unter dem ATP- und dem ADP-Gehalt. Die höchsten Werte waren wieder im Sperma des Schafes zu finden. Das wenigste AMP besaßen die Spermien von Hund und Schwein (Tab. 6).

Tab. 6: ATP-, ADP- und AMP-Gehalt (10^{-9} mol/10^{8} Spermien; $\bar{x} \pm s$), sowie durchschnittlicher "Adenylate energy charge" (AEC) im Sperma verschiedener Spezies

SPEZIES	ATP	ADP	AMP	AEC
Mensch n = 4	15,07 ± 2,50	9,4 ± 1,41	2,92 ± 3,42	0,722
Schaf n = 8	18,66 ± 9,42	11,88 ± 4,99	8,41 ± 3,76	0,632
Hund n = 2	15,87 ± 1,10	6,69 ± 1,78	2,82 ± 0,48	0,757
Schwein n = 4	11,12 ± 1,13	8,82 ± 0,35	1,15 ± 0,96	0,736
Rind n = 10	10,97 ± 2,23	10,92 ± 4,78	5,7 ± 3,42	0,596
Ziege n = 2	8,81 ± 6,30	6,57 ± 2,24	4,63 ± 1,10	0,605
Pferd n = 2	6,63 ± 0,02	5,45 ± 0,89	4,35 ± 0,49	0,569
Huhn n = 2	2,21 ± 1,25	4,73 ± 3,99	7,67 ± 9,50	0,313

Bei den Säugetieren und dem Menschen fiel der Nucleotidgehalt von ATP über ADP zum AMP ab. Auch hier bildete das Huhn eine Ausnahme. Bei ihm fand sich eine steigende Tendenz von ATP über ADP nach AMP.

Diese Relation schlug sich im Parameter der "Adenylate energy charge" nieder. Dieser Wert lag bei Mensch, Schaf, Hund, Schwein, Rind, Ziege und Pferd von 0,56 bis 0,75. Er war beim Huhn mit 0,31 deutlich niedriger (Tab. 6).

3.3.2.4. ATP- und Motilitätsabfall während des Tiefgefriervorgangs bei fraktionierter und unfraktionierter Glyzerinzugabe

An Hand der Auswirkung einer fraktionierten und unfraktionierten Glyzerinzugabe auf die Samenzellen von Bullen bei der Tiefgefrierung sollte durch Vergleich mit der ansonsten üblichen Motilitätsschätzung überprüft werden, ob die ATP-Bestimmung für praktische spermatologische Fragestellungen aussagefähig ist.

Wurde bei den Versuchen der glyzerinhaltige Verdünner II tröpfchenweise zugegegen, war kein Motilitäts-

abfall erkennbar. Der Anteil motiler Spermien lag nach der ersten Verdünnung mit Tris-Eidotterpuffer, wie nach der schonenden Glyzerinzugabe und der anschließenden Abkühlung auf 5°C zwischen 70 und 80 %. Die Tiefgefrierung reduzierte die Motilität dann auf 40 %. Ein an den aufgetauten Spermien durchgeführter Kälteschock im Eisbad, verursachte einen weiteren leichten Motilitätsrückgang um ca. 5 % (Abb. 35, Linie a).

Hingegen war bei gleichzeitiger Zugabe der gesamten Glyzerinmenge ein deutlicher Abfall der Beweglichkeit von etwa 15 % zu erkennen. Das Abkühlen und die Tiefgefrierung wirkte sich jedoch wie bei den Spermien aus, denen Glyzerin fraktioniert zugegeben worden war (Abb. 35, c).

Der ATP-Gehalt der Samenzellen blieb in nativem Sperma und nach erstmaliger Verdünnung ohne Glyzerin auf fast gleicher Höhe. Wurde Glyzerin auf einmal zugesetzt, fiel ATP von Werten um 20 nmol pro 10^8 Spermien auf 12 nmol ab. Der Abkühlvorgang reduzierte ATP um weitere 10 % und nach der Tiefgefrierung war in den aufgetauten Spermien nur mehr 12 % des Ausgangswertes zu finden (Abb. 36, d).

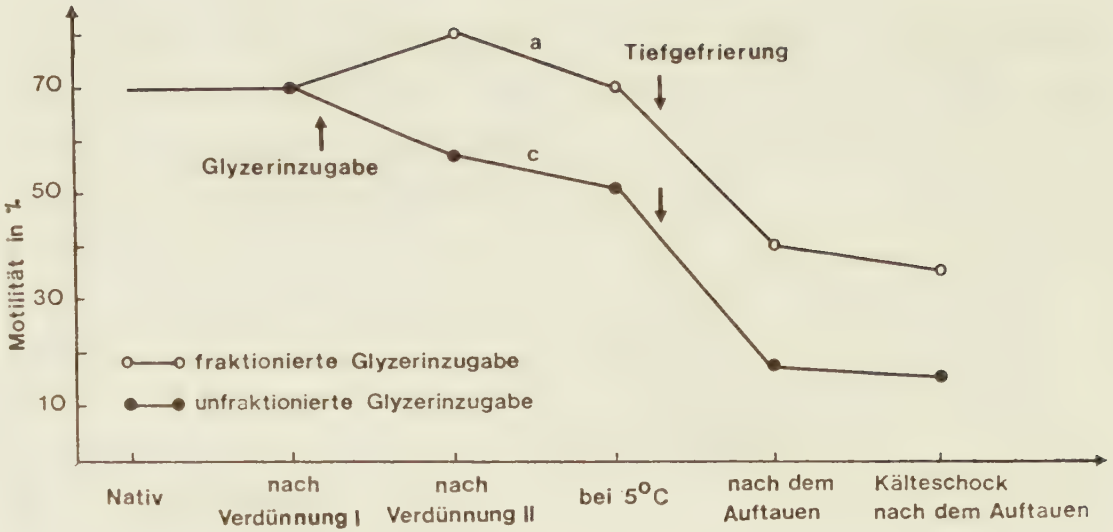


Abb. 35: Motilität bei unterschiedlicher Glyzerinzugabe

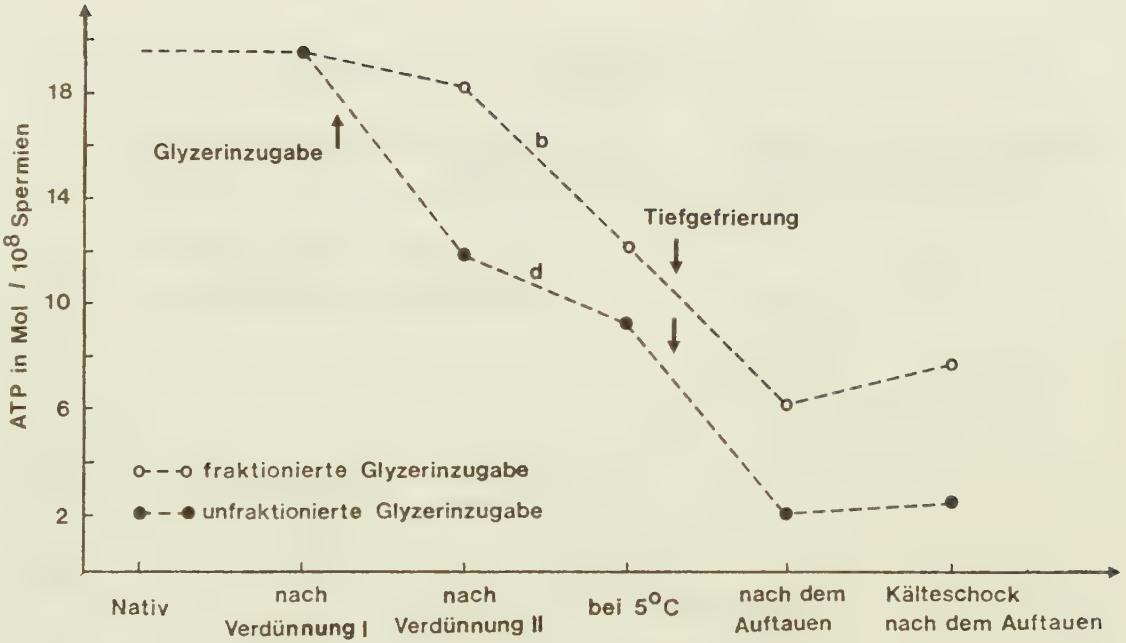


Abb. 36 : ATP bei unterschiedlicher Glyzerinzugabe

Im Gegensatz dazu ergab sich bei schonender Glyzerinzugabe nur ein geringer ATP-Verlust. Er verminderte sich dann jedoch durch die Abkühlung von 19 nmol pro 10^8 Spermien auf 13 nmol und um weitere 6 - 7 nmol durch die Tiefgefrierung. Der Endwert lag mit etwa 6 nmol weit über dem glyzeringestresster Spermien von 2 nmol/ATP/10^8 Spermien (Abb. 36,b).

Vergleicht man beide Arten der Glyzerinzugabe, so ergibt sich, daß bei fraktioniertem Zusatz nach dem Tiefgefrieren noch ca. 30 Prozent des ATPs der Nativspermien vorhanden ist, während nach unfraktionierter Beimischung nur noch 12 % des Ausgangswertes gefunden wurden.

Weiter ist auffallend, daß sowohl bei unfraktionierter Glyzerinzugabe, wie auch durch die Abkühlung, ATP wesentlich stärker abnahm, als dies der Rückgang der Motilität vermuten ließ. Zwar verlief die Motilität der Spermien in etwa parallel zum ATP-Gehalt, doch fiel bei der Schädigung durch Glyzerin oder Kälte ATP deutlicher ab, als die Motilität zurückging.

Der Kälteschock verringerte zwar die Motilität, erhöhte aber das in der Probe meßbare ATP.

3.2.2.5. Der ATP- und ADP-Gehalt von Bullenspermien, die auf unterschiedliche Glyzerinendkonzentrationen verdünnt worden waren, bei + 20°C, bei + 5°C und nach dem Auftauen

Bullenspermien aus 6 verschiedenen Ejakulaten wurden in split-sample-Technik auf 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Prozent Glyzerinendkonzentration mit Tris-Eidotterpuffer verdünnt. Es wurde der ATP- und ADP-Gehalt bei + 20°C, nach der Abkühlung auf + 5°C und nach dem Auftauen ermittelt. Alle angegebenen ATP- und ADP-Werte beziehen sich auf 10^8 Spermien. Die Streuung ist in Klammern angegeben.

Bei +20°C hatten Bullenspermien, die ohne Glyzerin verdünnt worden waren einen ATP-Gehalt von 13,48 nmol bei einer Streuung von 3,54 in dem Mittelwert (Abb. 37). Bei einem 2 prozentigen Glyzerinanteil in der Endverdünnung konnte im Durchschnitt aller sechs Ejakulate 8,2 nmol ATP (2,71) gemessen werden. Es stieg bei 4, 6 und 8 Prozent auf 8,25 (2,04), 9,37 (3,27) und 9,3 (2,89)nmol langsam an und erreichte mit 14,3 nmol (7,77)bei einem 10 prozentigen Glyzerinanteil den höchsten Wert.

Nach einer Abkühlung der Spermien auf + 5°C betrug der mittlere ATP-Gehalt bei 0 % Glyzerin 7,88 (3,01) nmol,bei 2 % 8,27 (0,79) nmol, bei 4 % 9,69 (1,58) nmol, bei 6 % 8,34 (2,26) nmol, bei 8 % 6,16 (0,91) nmol und bei 10 % 7,6 (2,21) nmol.

Nach dem Auftauen hatten die Spermien,die ohne Glyzerin tiefgefroren waren,2,12 (0,65) nmol ATP. Bei den mit Glyzerin tiefgefrorenen Spermien betrug der durchschnittliche ATP-Gehalt zwischen 3,0 (1,0) und 3,96 (1,96) nmol.

Der ADP-Gehalt bei + 20°C verhielt sich ähnlich den ATP-Werten bei der gleichen Temperatur. Er betrug in glyzerinfrei verdünnten Spermien 6,74 (2,94)nmol, sank bei 2 prozentigem Glyzerinanteil auf 3,38 (1,81) nmol ADP ab und blieb bis 8 % fast gleich, um dann bei 10 prozentiger Glyzerinkonzentration auf 9,89 (5,82) nmol ADP anzusteigen (Abb. 38).

Nach der Abkühlung der Spermien auf + 5°C verhielten sich ADP und ATP ebenfalls fast parallel zueinander. ADP war niedrig bei 0 % Glyzerin, stieg bei 2, 4 und 6 % Glyzerinanteil auf ein fast gleiches Niveau an und nahm bei 8 und 10 % Glyzerin wieder ab.

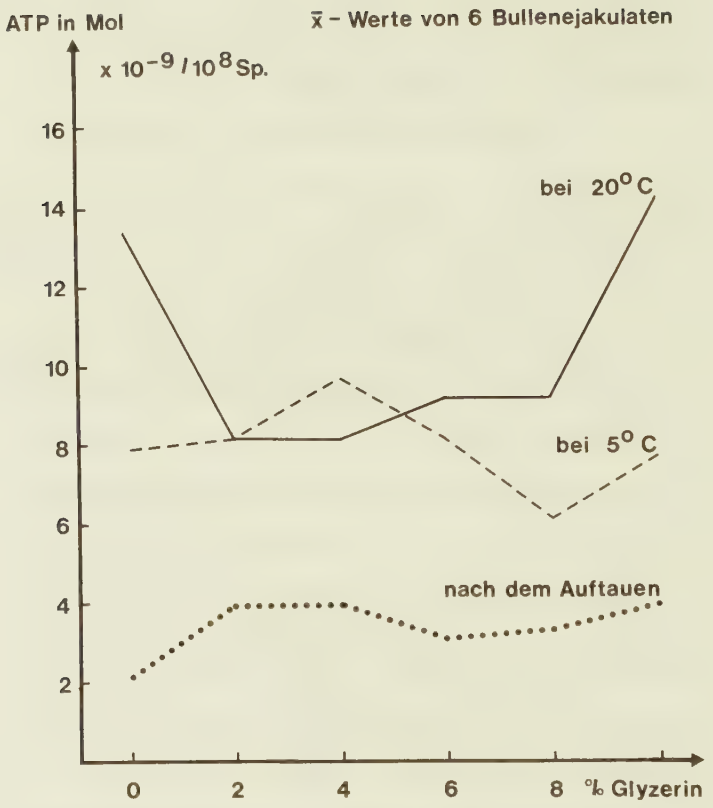


Abb. 37: ATP-Gehalt von Bullensperma, das auf verschiedene Glyzerinendkonzentrationen verdünnt worden war

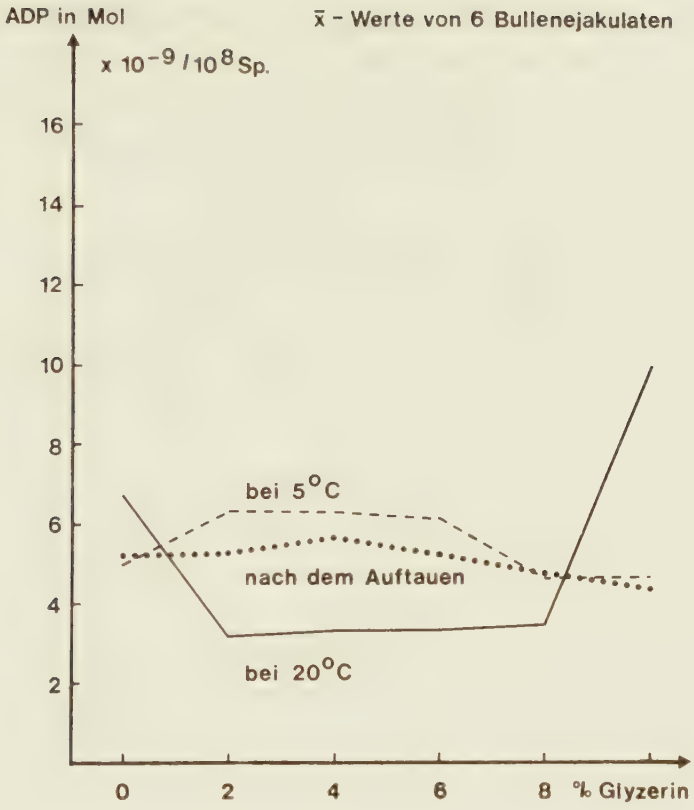


Abb. 38 : ADP-Gehalt von Bullensperma, das auf verschiedene Glyzerinendkonzentrationen verdünnt worden war

Nach dem Auftauen war der durchschnittliche ADP-Gehalt von der glyzerinfreien Probe bis zur 6 prozentigen Glyzerinverdünnung mit 5,36 (3,38) nmol, 5,3 (2,12) nmol, 5,73 (3,87) und 5,37 (4,28) nmol ADP nahezu gleich und sank bei 8 und 10 Prozent auf 4,78 (1,75) bzw. 4,32 (1,66) nmol ADP ab.

Betrachtet man die Gesamtheit der durchschnittlichen ATP- und ADP-Werte, so fällt auf, daß ATP bei + 20°C am höchsten war. Es war leicht erniedrigt bei + 5°C, aber wesentlich geringer in nach dem Tiefgefrieren aufgetauten Spermien.

Der ADP-Gehalt war im Durchschnitt am niedrigsten bei + 20° C, am höchsten bei 5°C und lag in aufgetauten Spermien zwischen diesen Werten.

Weiter ist das synchrone Verhalten der ATP- und ADP-Werte auffallend. Sank der ATP-Gehalt der Spermien bei 20°C in den Proben mit 0 % und 2 % Glyzerinendkonzentration von 13,48 nmol auf 8,20 nmol ab, so reduzierte sich auch ADP von 6,74 nmol auf 3,38 nmol. Diese Tendenz des gleichen ATP- und ADP-Verlaufs konnte bei + 20°C, bei + 5°C und nach dem Auftauen beobachtet werden.

Bemerkenswert war, daß bei + 20°C weniger ADP gemessen werden konnte, als bei + 5°C und nach dem Auftauen.

4. Diskussion

Die Biolumineszenz wurde als enzymatisches Nachweisverfahren von ATP in der Spermatologie erstmalig von BRACKETT und WILLIAMS (1967), BROOKS (1970b) und PRINZEN (1977) eingesetzt. PFETSCH (1979) beschäftigte sich dann eingehend mit der ATP-Messung im Sperma verschiedener Haustiere und überprüfte die Einsatzmöglichkeit des ATP-Meßsystems der Firma LKB-Wallac. Er beschreibt den gegenüber einer ATP-Bestimmung in Nucleotidreinsubstanzen gänzlich anderen Lumineszenzverlauf bei der ATP-Messung von nativem Sperma. In einer ATP-Reinlösung ist vom Beginn einer Biolumineszenzreaktion an ein konstantes Lichtsignal zu beobachten, wohingegen es mit Nativsperma zu einem steilen Lichtemissionsanstieg nach Reaktionsbeginn kommt, der in ein Plateau übergeht und dann ebenso schnell wieder abfällt. Nach Meinung von PFETSCH (1979) ist die anfängliche Lumineszenzzunahme bis zum Erreichen des Maximums eine Folge der Permeabilitätserhöhung der Samenzellen nach Reaktionsbeginn. Damit verbunden wird es dem Luciferin-Luciferase-System erleichtert, mit dem ATP der Spermien zu reagieren. Der dem Maximum folgende schnelle Lumineszenzabfall

wird dann auf ATPasen aus dem Seminalplasma zurückgeführt. Das gehäufte Vorkommen von Nucleotidasen im Sperma vieler Spezies wurde schon von MANN (1945a), sowie HEPPEL und HILMOE (1952) beschrieben.

Durch Erhitzen von Sperma konnte die von PFETSCH (1979) vermutete ATPasen-Wirkung während der Biolumineszenzmessung bestätigt werden. Nach Hitzebehandlung entfiel der für Nativsperma typische ATP-Abfall. Die Lumineszenz blieb konstant. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluß gezogen, daß die Enzyme des Seminalplasmas denaturiert und ihre ATP-abbauende Wirkung im Verlauf einer Luciferin-Luciferasereaktion aufgehoben worden war (3.2.2.1.). Auch konnte jetzt sofort nach Meßbeginn die maximale Lichtemission registriert werden. Bei Nativsperma vergehen, wie erwähnt,bis zum Erreichen des Lumineszenzmaximums noch einige Sekunden. Der Prozeß des Verfügbarmachens der Adenosinnucleotide für eine Messung wurde durch die Hitzedenaturierung des Spermas vorweggenommen. Es wird angenommen, daß die Wandstruktur der Spermien zerstört und die Nucleotide freigesetzt werden. Durch die gleichzeitige Zerstörung der ATPasenwirkung, bleibt ein Maximum an ATP im Verlauf

einer Biolumineszenzreaktion erhalten.

Beide Faktoren, sowohl die Denaturierung der Enzyme des Samenplasmas, wie auch eine erhöhte ATP-Freisetzung erklären das gegenüber nativem Sperma vermehrt meßbare ATP. Vergleicht man den ATP-Gehalt von erhitzt und nativ gemessenen Spermien verschiedener Spezies, so zeigt sich die größte Differenz bei Kaninchen, Schaf und Rind (Kap. 3.3.2.2.). Bei diesen Tierarten fiel in Nativproben nach Erreichen des Lumineszenzmaximums der ATP-Gehalt am stärksten ab und lag wesentlich unter dem hitzebehandelten Spermas. In Nativproben von Mensch, Pferd und Hund war im Verlauf einer Lumineszenzreaktion ein geringerer ATP-Schwund zu beobachten und das Maximum von Nativsperma lag näher bei den Werten erhitzter Ejakulate. Die geringste Differenz zwischen hitzedenaturierter und unbehandelter Probe ergab sich beim Hahn, beim Rüden und beim Eber. Hier fiel während der Lumienszenzmessung von nativem Sperma ATP auch am langsamsten ab. Es läßt sich deshalb vermuten, daß bei dünnen Ejakulaten, wie bei Mensch, Schwein, Hund und Pferd weniger ATPasen im Sperma vorkommen, als bei Schaf und Rind mit sehr dichten

Ejakulaten.Diese Annahme stimmt mit Beobachtungen von SCHIRREN et al. (1979) überein.Er wies im Sperma des Mannes eine positive Korrelation zwischen der Spermiendichte und den ATPasen im Seminalplasma nach. Eine Ausnahme scheint der Hahn zu bilden. Trotz hoher Dichte seines Spermas konnte ein ATP-Rückgang während der Biolumineszenzmessung einer Nativprobe nicht festgestellt werden. Auch sind bei ihm ATP-Gehalt in erhitzter und unbehandelter Proben fast identisch.

Die Erhitzung einer Probe sollte in einem dünnwandigen Reagenzglas so erfolgen, daß in möglichst kurzer Zeit + 100°C erreicht wurden. Dies bewirkt ein rasches Abstoppen der Stoffwechselvorgänge und eine weitgehende Freisetzung des gesamten ATPs. Dadurch kann der Status Quo der Zellen zum Zeitpunkt der Hitzeeinwirkung exakt erfaßt werden. Die thermische Denaturierung wird zum Aufschluß von tierischen Geweben in der enzymatischen Diagnostik seit langem eingesetzt (HESS und BRAND, 1974).

Nach der Standardisierung der Spermaerhitzung wurde die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens überprüft. Sie erwies sich bei einem Variationskoeffizienten

von 4,7 Prozent als sehr zufriedenstellend (Tab. 4).

Durch die Trennung von Bullenspermien von ihrem Seminalplasma und die Untersuchung der Wechselwirkung dieser beiden Komponenten aufeinander konnte der Einfluß der ATP-spaltenden Enzyme und ihre Herkunft im Sperma weiter belegt werden (Kap. 3.3.2.1.). In seminalplasmafreien,lebenden Spermien war mit der Biolumineszenzreaktion ein höherer ATP-Gehalt nachweisbar als in den gleichen Zellen mit Samenplasma. Der ATP-Gehalt von seminalplasmafreien Samenzellen lag nur wenig unter dem Wert erhitzer Proben. Unter diesen Bedingungen fiel auch im Verlauf einer Lumineszenzmessung das ATP langsamer ab als bei in Seminalplasma suspendierten Spermien. Das Verhältnis des ATP-Rückgangs von plasmafreien Spermien zu Spermien mit Seminalplasma entspricht in etwa der Relation zwischen den auf den Spermien lokalisierten ATPasen zu den Plasma-ATPasen. ROUSSEL und STALLCUP (1966) ermittelten ein Verhältnis von fünf Einheiten ATPasen im Seminalplasma zu einer Einheit in den Samenzellen.

An wenigen sehr dichten Ejakulaten wurde trotz Erhitzens nach Reaktionsbeginn ein kurzer Lumineszenzabfall beobachtet, der schnell in eine konstante

Lichtemission einmündete. Diese Kinetik ist typisch für das Phänomen der Produkthemmung (LUNDIN et al., 1976). Durch hohe ATP-Mengen wird die Luciferin-Luciferase erschöpft, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Diese Erscheinung beeinträchtigt die Genauigkeit einer Messung. Zur Vermeidung dieser Fehlerquelle durch die Produkthemmung wurden deshalb nicht wie von PFETSCH (1979) 10 Mikroliter, sondern nur 1 µl Sperma zur Nucleotidbestimmung verwendet.

Durch die Anwendung der Nucleotide releasing substance (NRS) sollte die Möglichkeit einer verbesserten ATP-Extraktion aus Nativsperma überprüft werden. Dies konnte durch hohe NRS-Gaben erreicht werden (Kap. 3.2.2.2.). Entgegen den Angaben des Herstellers war es nicht möglich durch ein NRS-Spermaverhältnis von 1 : 1 im Biolumineszenzansatz die Lichtemission zu erhöhen. Die Menge NRS, die nötig war, um ATP vermehrt freizusetzen, hing vielmehr ab von der Dichte der untersuchten Spermaproben. In dünnen Ejakulaten ($<$200 000 Sp./µl) genügten meist 200 µl um eine größtmögliche ATP-Extraktion zu erreichen, wohingegen sich die Lichtemission in dichten Spermaproben ($\geq$ 1000 000 Sp./µl) bis zu einem Verhältnis von 800 µl

NRS zu 10 µl Sperma stetig steigern ließ. In einem Versuch mit verschiedenen Spermaverdünnungsreihen konnte gezeigt werden, daß bei einer Zellzahl von 300 000 Spermien im Biolumineszenzansatz von einem Milliliter 100 µl NRS genügten, um alles ATP zu extrahieren (Abb. 20).

Mit NRS konnte in einer Nativprobe mehr ATP gemessen werden als im selben Sperma ohne Detergenszugabe. Das ATP-Maximum lag über dem ohne NRS gemessener Proben, jedoch unter dem Wert hitzebehandelten Bullenspermas. Das heißt, daß zwar durch NRS mehr ATP für eine Biolumineszenzreaktion verfügbar gemacht werden konnte, die extrahierende Wirkung einer Hitzedenaturierung jedoch nicht erreicht werden konnte. Eine gewisse Interferenz der ATPasen, die durch Hitzedenaturierung ebenfalls ausgeschaltet werden, ist bei dieser Schlußfolgerung ebenfalls in die Überlegungen miteinzubeziehen. Durch NRS konnte zwar ein höherer ATP-peak erreicht werden, doch ähnelte die Reaktionskinetik des detergensbehandelten Spermas der von Nativproben (Abb. 19). Nach Reaktionsbeginn war wie in ohne NRS gemessenen Nativproben ein anfänglicher Lumineszenzanstieg zu beobachten, der nach etwa 15 Sekunden in ein Maximum mündete und schnell wieder

abfiel. Der, in nativem Sperma auf die Wirkung von ATPasen zurückgeführte ATP-Rückgang im Verlauf einer Lumineszenzreaktion, war auch bei der Anwendung von NRS vorhanden. Die nucleotidabbauenden Enzyme des Seminalplasmas werden in ihrer Wirkung durch das Detergens NRS offensichtlich nicht beeinflußt.

Bei der Überprüfung der Wirkung von NRS auf ATP-Reinlösungen konnte ebenfalls eine lumineszenzsteigernde Wirkung festgestellt werden (Abb. 17). Trotz gleicher ATP-Konzentration nahm die Lichtemission bei wachsendem NRS-Anteil in einem Biolumineszenzansatz zu. Dies kann sowohl auf einen stimulierenden Effekt des Detergens auf die Luciferin-Luciferase-Reaktion zurückgeführt werden, als auch mit der Vermutung begründet werden, daß mehr NRS weniger Puffer in einem Ansatz bedeutet und damit der lumineszenzinhibitorische Effekt der Ionen aus dem Puffer geringer wird.

Der Einsatz von NRS beim Nachweis von ATP in Sperma mit der Biolumineszenzmethode erbringt neben einer Erhöhung der ATP-Ausbeute während einer Messung keine Verbesserung des Systems, da weiterhin die Überlagerung der Meßergebnisse im Nativsperma durch die ATP-spaltenden Enzyme aus dem Seminalplasma bleibt.

In hitzedenaturiertem Samen ist NRS wirkungslos.

Nach Meinung einiger Autoren ist die absolute ATP-Konzentration als Beurteilungsparameter des Stoffwechselstatus einer Zelle weniger aussagekräftig, als eine Betrachtung der ATP-, ADP- und AMP-Verhältnisse zueinander (CHAPMAN et al., 1971; SWEDES et al., 1975; HOLM-HANSEN und KARL, 1978). Deshalb sollte in vorliegender Arbeit die Möglichkeit einer ADP- und AMP-Bestimmung in Sperma erarbeitet werden. Bei der Überprüfung des von LUNDIN et al. (1976) sowie HOLM-HANSEN und KARL (1978) beschriebenen Verfahrens zum Nachweis von ADP und AMP benötigte die Pyruvatkinase zur vollständigen Umwandlung von ADP in ATP ein bis zwei Minuten (Kap. 3.2.3.) Bei der Messung von ATP und ADP in Nativsperma war es nicht möglich nach der ATP-Registrierung durch Pyruvatkinasezugabe ADP zu bestimmen. Nach dem Erscheinen des Lumineszenzmaximums nahm ATP rasch ab und die Pyruvatkinase fand nur mehr einen geringen Teil der bei Reaktionsbeginn vorhandenen Nucleotide vor. Es kann vermutet werden, daß die Nucleotidasen des Seminalplasmas die Nucleotide schon stark abbauten, während noch die Umwandlung von ADP in ATP erfolgte.

Wurde die Pyruvatkinase aber vor dem Start einer Biolumineszenzreaktion durch das Sperma dem Luciferin-Luciferasegemisch zugesetzt, konnte ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden. Die Folge dieses Vorgehens war ein gemeinsames Lichtsignal für ATP und ADP. ADP wurde von Beginn der Lumineszenzmessung an in ATP verwandelt, so daß sich beide Nucleotide zu einem Wert summierten. Es war dann möglich, den ADP-Gehalt einer Probe durch zwei getrennte Messungen desselben Ejakulates zu ermitteln. In einer ersten Messung wurde das ATP einer Spermaprobe ermittelt und in einer zweiten durch vorhergehende Pyruvatkinaseapplikation der gemeinsame Wert aus ADP und ATP. Die Differenz aus den Werten der beiden Messungen ergab den ADP-Gehalt einer untersuchten Probe.

In nativem Sperma konnte jedoch während der ein bis zwei Minuten dauernden Umwandlung von ADP in ATP ein erheblicher Nucleotidabbau durch Plasmanucleotidasen unterstellt werden. Deshalb war jedes Meßergebnis zu interpretieren:

Meßergebnis bei		ADP in	von Nucleotidasen
der Messung von	=	einer	- abgebautes ADP
Nativsperma		Probe	

Die Enzyme des Seminalplasmas mindern bei der Messung von Nativsperma bereits während des Ablaufens einer Biolumineszenzreaktion den Nucleotidgehalt einer Spermaprobe. Daraus ergeben sich Überlagerungen, die eine quantitative Interpretation der Ergebnisse nicht zulassen. Durch die Hitzebehandlung von Sperma konnte die Wirkung der die Nucleotide - spaltenden Enzyme verhindert werden. Der ATP-Kurvenverlauf von erhitzten Proben glich dem von ATP-, ADP-Reinsubstanzen ohne die Überlagerungen der Nucleotidasen. Die Lichtemission von erhitztem Sperma blieb konstant und es war gegenüber Nativsperma Zeit gewonnen für eine Umwandlung allen ADPs und dessen vollständiger Erfassung. Wegen der Nachteile, die sich aus der Messung von nativem Sperma ergeben, ist das Verfahren der ATP- und ADP-Bestimmung in erhitzten Proben vorzuziehen.

In nativem Sperma AMP nachzuweisen war unmöglich (Kap. 3.2.4.). Die Myokinase zeigte eine sehr träge katalytische Wirkung und benötigte zu einer voll-

ständigen AMP- ADP-Umwandlung ca. zehn Minuten. Während AMP in ADP und weiter in ATP verwandelt wurde, hatten bei der Messung von nativem Sperma die Nucleotidasen des nichterhitzten Seminalplasmas längst alle Metaboliten abgebaut und verhinderten damit eine Lumineszenz. Diese Fakten schlossen eine AMP-Ermittlung in Nativsperma aus.

Hingegen konnte in hitzebehandelten Ejakulaten AMP erfaßt werden. Die starke Eigenlumineszenz der Myokinase und die Notwendigkeit einer vorhergehenden Aktivierung der Myokinase im Biolumineszenzgemisch erforderte zwei getrennte Messungen des gleichen Ejakulats zur Feststellung aller drei Nucleotide. In einem ersten Ansatz wurde ATP und nach Pyruvatkinasezugabe ADP ermittelt. Ein zweiter Ansatz bestehend aus Puffer, AMR, PEP, Pyruvatkinase und Myokinase mußte fünfzehn Minuten vorreagieren. Danach wurde der Lumineszenzbackground der Reagenzien festgehalten und anschließend das erhitzte Sperma zugesetzt. Das dann zu messende Lumineszenzmaximum bestand aus der Summe der Nucleotide einer Probe und dem Background des Reaktionsgemisches. AMP konnte berechnet werden, indem von der Gesamtlumineszenz des zweiten Ansatzes der Background und die Lichtemission für ATP und ADP

aus dem ersten Ansatz subtrahiert wurden.

Bei der ATP-Gehaltsermittlung von Ejakulaten verschiedener Spezies wurde der durchschnittlich höchste ATP-Gehalt von 18,66 nmol pro 100 Millionen Samenzellen beim Schafbock festgestellt. Es folgte das Sperma vom Rüden mit durchschnittlich 16 nmol, vom Mann mit 15, vom Eber und vom Bullen mit ca. 11, vom Ziegenbock mit 9 und vom Hengst mit ca. 7 nmol ATP/10^8 Spermien. Den geringsten ATP-Gehalt von 2,21 nmol/10^8 Spermien wies das Ejakulat von Hähnen auf (Tab. 6). Diese Werte bewegten sich in der Größenordnung der von anderen Autoren gefundenen ATP-Mengen (Tab. 1). Sie lagen jedoch deutlich über den Werten, die PRINZEN (1977) und PFETSCH (1979) in nativen Spermaproben ermitteln konnten. Vor allem BRACKETT und WILLIAMS (1967) und BROOKS (1971) fanden mit dem Luciferin-Luciferaseverfahren und mit Hitze- bzw. Trichloressigsäureextraktion ATP-Gehalte, die sich im Rahmen der Resultate vorliegender Arbeit bewegen.

Der ADP-Gehalt war in frischen Spermien von Mensch und Säugetieren niedriger als ihr ATP-Gehalt. Am meisten ADP war wiederum beim Schaf, am wenigsten beim Huhn festzustellen (Tab. 6). Das Verhältnis von ATP

zu ADP schwankte von 1 : 1 beim Rind bis 2 : 1 beim Hund. Im Gegensatz zu anderen Spezies war beim Huhn mehr ATP als ADP nachweisbar. Hier betrug die ATP-ADP-Relation 1 : 2. Auch die ermittelten ADP-Gehalte stimmten weitgehend mit den Angaben anderer Autoren überein (Tab. 2).

Diese Beobachtungen konnten auch bei der AMP-Ermittlung gemacht werden. Der AMP-Gehalt war im Säugersperma ebenfalls geringer als der ATP- und ADP-Gehalt, wohingegen im Hahnsperma AMP ATP und ADP übertraf. Die ATP-AMP-Relation betrug 10 : 1 beim Schwein, 1,5 : 1 beim Pferd und 1 : 3,5 beim Hahn (Tab. 3,6).

Die Verhältnisse der Nucleotide von Säugerspermien zueinander spiegelten sich in den Werten der Adenylsäureenergieladung (AEC) wieder. Sie betrugen beim Pferd 0,57 und waren mit 0,76 beim Hund am höchsten. Während der Wachstumsphase von Bakterien war ein AEC von 0,5 bis 0,8 errechnet worden (CHAPMAN et al., 1971). Sowohl bei kolonienbildenden Bakterien als auch bei Spermien handelt es sich um stoffwechselaktive Zellen. Es ist deshalb denkbar, daß bei gleicher Stoffwechsellage auch in sehr unterschiedlichen Zellpopulationen ähnliche Metabolitenverhältnisse vor-

liegen. Diese Vermutung wird auch von SWEDES et al. (1975) sowie CHAPMAN und ATKINSON (1977) geäußert, In diese Vorstellung paßt nicht der AEC-Wert des Hahnes von 0,31.

Nach Abklärung methodischer Fragen wurde die Spermatiefgefrierkonservierung bei unterschiedlicher Glyzerinendkonzentration als Modell für die Brauchbarkeit der ATP-Bestimmung mit dem Biolumineszenzverfahren herangezogen. Parallel dazu wurde wie üblich die Motilität der Spermien beurteilt. Je nach Vorgehen beim Tiefgefrieren von Bullenspermien kann sich die Motilität der Samenzellen um 30 - 95 % verringern (EIBL, 1959). Da zwischen der Motilität und dem ATP-Gehalt von Spermien ein enger Zusammenhang besteht (PRINZEN, 1977; FOULKES u. MACDONALD, 1979; PFETSCH, 1979), war von Interesse, ob geringgradige Unterschiede,wie sie z.B. durch die fraktionierte und unfraktionierte Glyzerinzugabe zu erwarten sind, mit Hilfe der ATP-Bestimmung besser zu belegen sind, als durch die subjektive Motilitätsschätzung. Nach Zugabe des glyzerinfreien Vorverdünners (Verdünnung I) änderten sich die Motilität und der ATP-Gehalt der Samenzellen nur geringfügig (Abb. 35,36). Wurde dann durch den glyzerinhaltigen Zweitverdünner (Verdünnung II) alles

Glyzerin unfraktioniert zugegeben, sank die Motilität um ca. 15 Prozent. Wesentlich stärker ging ATP zurück. Es verringerte sich von etwa 20 nmol ATP/ 10^8 Sp. nach der ersten Verdünnung auf weniger als 12 nmol nach der Glyzerinzugabe. Die ATP-Abnahme betrug also 40 Prozent. Ein ähnlicher Effekt konnte bei schonender fraktionierter Glyzerinzugabe nicht gesehen werden. Der dabei zu beobachtende ATP-Rückgang von 7 % ist als gering zu bezeichnen.

Nach den Verdünnungsschritten I und II bei + 20°C folgte die Abkühlung der Spermien auf + 5°C. Auch hier war der ATP-Abfall stärker, als es der Motilitätsrückgang vermuten ließ. Fraktioniert und unfraktioniert mit Glyzerin verdünnte Spermien reagierten auf die Abkühlung mit einem fast gleichen Motilitätsverlust. ATP ging in der fraktioniert verdünnten Probe stärker zurück als in der unfraktioniert verdünnten. Bei den nach dem Tiefgefrieren wieder aufgetauten Spermien waren ATP und Motilität gegenüber der Messung bei + 5°C unabhängig von der Vorbehandlung in etwa gleichem Maße gesunken.

Bemerkenswert war, daß bei dem anschließend durchgeführten Kälteschock die Motilität zwar weiter sank,

ATP jedoch vermehrt in den Spermaproben nachgewiesen werden konnte. Als Erklärung ließe sich eine kälteschockbedingte Permeabilitätserhöhung der Spermienwand mit verstärkter ATP-Freisetzung, eine Nucleotidaseninhibierung durch Kälte, oder eine belastungsbedingte Steigerung der ATP-Produktion denken. Da sich die ATP-Erhöhung auch mehrere Minuten nach dem Kälteschock nachweisen ließ, das permeabilitätsbedingt vermehrt ausgeflutete ATP in dieser Zeit aber durch Nucleotidasen abgebaut worden wäre, ist vor allem die auf die Spermien einwirkende Belastung als Ursache zu berücksichtigen.

Durch unterschiedliche Glyzerinmengen im Verdünner II sollte die Auswirkung verschiedener Glyzerinendkonzentrationen auf den ATP-ADP-Gehalt der Spermien in den einzelnen Stadien der Tiefgefrierung studiert werden. Bei + 20°C wurde bei Samenzellen, die ohne Glyzerin verdünnt waren, im Durchschnitt von sechs Ejakulaten etwa 14 nmol ATP pro 100 Millionen Zellen gemessen (Abb. 37). Der ATP-Gehalt sank bei 2 prozentigem Glyzerinanteil stark ab und blieb bis zu einer Konzentration von 8 % auf einem Nievau von 8 - 9 nmol. 10 % Glyzerinanteil ließ ATP überraschend

stark auf 14 nmol ansteigen. Auch hierbei ist als eine Erklärung die schon im letzten Versuch erwähnte Vermutung einer Stressreaktion der Samenzellen plausibel. Möglicherweise versuchen Spermien, ein für sie ungünstiges Milieu zu verlassen und forcieren dabei ihre Motilität durch höhere ATP-Syntheseleistung.

Bei + 5°C lag der ATP-Gehalt im Durchschnitt aller Konzentrationen leicht unter dem bei + 20°C ermittelten. Eine starke ATP-Verringerung war bei tiefgefrorenen und anschließend aufgetauten Spermien festzustellen. Ihre Werte lagen zwischen 2 und 4 nmol ATP/10^8Sp. Der niedrigste lag bei Spermien, die ohne Glyzerin tiefgefroren waren und die höchsten bei 4, 8 und 10 prozentigem Glyzerinanteil.

Die ADP-Gehalte unterschieden sich in allen drei Temperaturbereichen innerhalb der einzelnen Glyzerinverdünnungsstufen nur unwesentlich (Abb. 38). Bei + 20°C waren zwischen 0 und 2 % und bei 10 % Glyzerinanteil die ADP-Werte deutlich höher als bei mittleren Glycerinkonzentrationen. Dies konnte auch am Verlauf des ATPs bei dieser Temperatur gesehen werden. Es fiel auf, daß der ADP-Gehalt von verdünnten Samenzellen bei + 20°C unter dem bei + 5°C und nach dem Auftauen höher als bei + 20°C lag.

Die ATP-ADP-Relation blieb zwar innerhalb eines Temperaturbereiches bei verschiedenen Glyzerinkonzentrationen nahezu gleich, doch differierte sie stark, verglich man die drei Temperaturen + 20°C, + 5°C und nach dem Auftauen miteinander. Bei + 20°C wurde ein ATP : ADP Verhältnis von etwa 3 : 1, bei + 5°C von 1,5 : 1 und nach dem Auftauen von 1 : 1,5 registriert. Die Frage, wie diese gegenüber + 20°C wesentlich höheren ADP-Gehalte bei + 5°C und nach dem Auftauen zu interpretieren sind, muß offengelassen werden.

5. Zusammenfassung

5.1. Es wurde überprüft, ob das Biolumineszenzverfahren zum Nachweis von ATP auch für eine ADP- und AMP-Bestimmung im Sperma von Mensch und Haustier geeignet ist.

5.2. Durch ein Erhitzen von Sperma konnten die Adenosinnucleotid-spaltenden Enzyme des Samenplasmas inaktiviert werden, so daß die Biolumineszenz für ATP nahezu konstant blieb. Dies war eine Voraussetzung für die quantitative ADP- und AMP-Messung.

5.3. Das Enzym Pyruvatkinase war in der Lage, in nativem und erhitztem Sperma ADP in ATP zum Nachweis mit der Luciferin-Luciferasereaktion zu verwandeln.

5.4. Durch das Enzym Myokinase war es möglich AMP für die Biolumineszenzreaktion verfügbar zu machen. Die langsame katalytische Wirkung der Myokinase ließ eine AMP-Messung nur in erhitztem Sperma zu.

5.5. Es wurden die ATP-, ADP- und AMP-Gehalte von Ejakulaten verschiedener Spezies ermittelt. Die meisten Nucleotide wurden in Spermien vom Schaf gefunden. Danach folgten die Samenzellen von Hund, Mensch, Schwein, Rind, Ziege, Pferd und Huhn.

5.6. Am Beispiel der Tiefgefrierkonservierung von Bullenspermien wurden die ATP- und ADP-Gehalte mit der Motilität verglichen, um die Brauchbarkeit dieses Nucleotidnachweises für praktische Fragestellungen zu überprüfen. Dabei verhielten sich ATP-Abfall und Motilitätsrückgang fast parallel zueinander. Noxen, wie die Glyzerinzugabe oder die Abkühlung der Spermien, waren im ATP-Rückgang deutlicher ausgeprägt als im Motilitätsverlust. Im Gegensatz zu ATP, das auf Noxen mit einem Abfall reagierte, zeigte ADP ein umgekehrtes Verhalten. Von ADP wurde bei + 5°C und nach dem Auftauen mehr gemessen als bei +20°C.

5.7. Die beschriebenen Methoden erlauben eine einfache und rasche ATP-, ADP- und AMP-Ermittlung in erhitztem Sperma verschiedener Spezies. Der Adenosinnucleotidnachweis mit der Biolumeneszenz ist als wertvolles Analyseverfahren in der spermatologischen Diagnostik anzusehen.

6. Summary

6.1. It was tested, whether the bioluminescense method for detection of ATP could be used to determine ADP and AMP in semen of animals as well as humans.

6.2. By heating the semen, one could inactivate the adenosinnucleotide splitting enzymes of the seminal plasma. The bioluminescense for ATP remained rather constant, which was a condition for the quantitative measurement of ADP and AMP.

6.3. The enzym pyruvatkinase was able to convert ADP in ATP for its detection using the luciferin-luciferase reaction in both the native and the heated semen.

6.4. It was possible to release AMP for the bioluminescense reaction using enzyme myokinase. The slow catalytic activity of the myokinase allowed AMP measurements only in the heated semen.

6.5. The ATP, ADP and AMP content in the semen of various species was determined. The greatest amount of nucleotides was found in sheep. Then

followed dog, man, pig, cattle, goat, horse and rooster.

6.6. In experiments concerning the deep-freeze preservation of bull semen, the measured ATP was compared with the motility estimate and it was tested whether this method is feasible in the practise. A close correlation between ATP decrease and motility reduction was observed. Harmful influences, such as the addition of glycerol or the cooling of the sperm cells were more pronounced with respect to ATP decrease as compared with motility reduction. In contrast to this, ADP increased under harmful influences. At $+5^{o}C$ and after thawing there was more ADP than at $+ 20^{o}C$.

6.7. The previously described methods permit an easy and immediate ATP, ADP and AMP measurement in the heated semen of various species. Bioluminescense is a valuable analytical process in the spermatological diagnosis for the determination of adenosinnucleotides.

7. Literaturverzeichnis

ANDERSON, J.M., FAINI, G.J. and WAMPLER, J.E. (1978): Construction of instrumentation for bioluminescense and chemiluminescense assays Methods in Enzymolgy ed. DELUCA, M.A., 57, 529-540, Academic Press, New York, San Francisco, London

ATKINSON, D.E. and WALTON, G.M. (1967): Adenosintriphosphate conservation in metabolic regulation J. Biol. Chem., 242, 3239-3241

BERGMEYER, H.U. (1974): Methoden der enzymatischen Analyse 3. Aufl. Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße

BISHOP, D.W. (1962): Reactivation of extracted sperm cell models in relation to the mechanism of motility Spermatozoan Motility, 251-268, Am. Assoc. Adv. Sci., Washington, D.C.

BOEHRINGER, Mannheim (1979): Adenosin-5'-triphosphat, Biolumineszenz-Test mit Luciferase (firefly) Aktuelle Biochemie, Produktinformation

BRACKETT, B.G. and WILLIAMS, W.L. (1967): ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma
Proc. Soc. Exp. Biol., 125, 1133-1136

BROOKS, D.E. (1970 a): Acid soluble phosporus compounds in mammalian semen
Biochem. J., 118, 851-857

BROOKS, D.E. (1970 b): Observation in the content of ATP und ADP in bull spermatozoa using the firefly luciferase system.
J. Reprod. Fert., 23, 525-528

BROOKS, D.E. (1971): Nucleotides in spermatozoa
J. Reprod. Fert., 25, 302-303

BUDDECKE, E. (1974): Grundriß der Biochemie, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin-New York

BURNASHEVA, S.A. (1958): On spermosin, the contractile protein of sperm cells.
Biochim., 23, 558-563

CALAMERA, J.C., GIOVENCO, P. and VILAR, O. (1979): Adenosintriphosphate in human spermatozoa
Andrology, 2, 225-229

CHAPELLE, E.W. and LEVIN, G.V. (1968): Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria
Biochem. Med., 2, 41-52

CHAPMAN, A.G. and ATKINSON, D.E. (1977):Adenine nucleotide concentrations and turnover rates
Adv. Microb. Phys., 15, 297-301

CHAPMAN, A.G., FALL, L. and ATKINSON, D.E. (1971): Adenylate energy charge in escherichia coli during growth and starvation
J. Bact., 108, 1072-1086

DELUCA,M.A. (1976): Firefly Luciferase
Adv. Enzymol. Relat. Areas Md. Biol., 44, 37-68

DELUCA, M.A. (1978): Bioluminescense and chemiluminescense.Methods in Enzymolgy 57
Acad. Press,New York, San Francisco, London

DELUCA,M.A. and MCELROY, W.D. (1974): Kinetics of the firefly luciferase catalysed reactions
Biochem., 13, 921-925

DELUCA,M.A. and MCELROY, W.D. (1978): Purification and properties of firefly luciferase
Methods in Enzymology, ed. DELUCA, M.A., 57, 3-14, Acad. Press, New York, San Francisco, London

DELUCA,M.A., LEONARD, N.J. GATES, B.J. and MCELROY, W.D. (1973): The role of $1,1^{6}$-ethenoadenosine

triphosphate and 1,N^6-ethenoadenosine monophosphate in firefly luminescense
Proc. Nat.Acad.Sci., 70, 1664-1666

DENBURG, J.L. and MCELROY, W.D. (1970): Anion inhibition of firefly luciferase
Arch. Bioch. Bioph., 141, 668-675

DUBOIS, R. (1885): Note sur la physiologie de pyrophores
C.R. Soc. Biol., 8, 559-572

EIBL, K. (1959): Lehrbuch der Rinderbesamung
Verlag Paul Parey Berlin, Hamburg

ENGELHARDT, V.A. and BURNASHEVA, S.A. (1957): On the localisation of the spermosin protein in sperm cells
Biochim., 22, 554-560

FOOTE, R.H., GRAY, L.C.. YOUNG, J.C. and DUNN, M.O. (1960): Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extender
J. Da. Sci., 43, 1330-1334

FOULKES, J.A. and MACDONALD, B.J. (1979): The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa
Theriogenology, 11, 313-319

GATES, B.J. and DELUCA, M.A. (1975): The production of oxyluciferin during firefly luciferase reaction
Arch. Bioch. Bioph., 169, 616-621

GILLES, R., PEQUEUX, A., SAIVE, I.J., SPRONCK, A.C. and THOME-LENTZ, G. (1976): Effect of various ions on ATP determinations using the "luciferine-luciferase"system
Arch. Int. Physiol. Bioch., 84, 807-817

GOTO, T., KUBOTA, I., SUZUKI, K. and KISHI, Y. (1973): Aspects of the mechanism of bioluminescense
2nd Intern. Conf. on Chemiluminescense and Bioluminescense, 325-335, Plenum, New York

HAMMER, K. und HIMPSEL, J. (1962): Lehrbuch der Physik
Verlag Oldenbourg, München

HARVEY, E.N. (1915): The effect of certain organic and inorganic substances upon light production by luminous bacteria
Biol. Bull. Mar. Lab., Mass., 29, 308-311

HARVEY, E.N. (1928): Photosynthesis in the absence of oxygen
Plant. Physiol., 3, 85-89

HARVEY, E.N. (1957): A history of luminescense from the earliest times
The American Philosophical Society, Philadelphia

HAYDN, R. (1968): Die Temperatur bei der Adaption vor der Tiefgefrierung von Bullenspermien
Vet. Med. Diss., München

HEPPEL, L.A. and HILMOE, R.J. (1952): Mechanism of enzymatic hydrolysis of adenosintriphosphate
J. Biol. Chem., 202, 217-226

HESS, B. und BRAND, K. (1974): Zell- und Gewebeaufschluß, Methoden der enzymatischen Analyse, ed. BERGMEYER, H.U., 3. Aufl., 423-437, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße

HOLM-HANSEN, O. and KARL, D. (1978): Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and evironmental samples
Methods in enzymolgy, ed. DELUCA, M. A., 57, 73-85, Acad. Press, New York, San Francisco, London

HOLMS, W.H., HAMILTON, I.D. and ROBERTSON, A.G. (1972): The rate of turnover of the adenosintriphosphate pool of escherichia coli

growing aerobically in simple defined media
Arch. Microbiol., 83, 95-109

HOSKINS, D.D. (1972): Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa
J. Biol. Cheim., 248, 1135-1140

JAWOREK, D., GRUBER, W. und BERGMEYER, H.U. (1974): Adenosin-5'-diphospat und Adenosin-5'-monophosphat
Methoden der enzymatischen Analyse, ed. BERGMEYER, H.U., 3, 2178-2181, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

KARL, D.M. and HOLM-HANSEN, O. (1978): Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples
Mar. Biol., 48, 185-197

KARLSON, P. (1974): Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Verlag Georg Thieme, Stuttgart

LARDY, H.A. and PHILLIPS, P.H. (1941a): Phospholipids as a source of energy for motility of bull spermatozoa
Amer. J. Physiol., 134, 542-548

LARDY, H.A. and PHILLIPS, P.H. (1941b): The interrelation of oxidative and glycolytic processes as sources of energy for bull spermatozoa
Amer. J. Physiol., 133, 602-609

LARDY, H.A., HANSEN, R.G. and PHILLIPS, P.H. (1945): The metabolism of bovine epididymal spermatozoa
Arch. Biochem., 6, 41-51

LEE, R.T., DENBURG, J.L and MCELROY, W.D. (1970): Substrate-binding properties of firefly luciferase, II. ATP-binding site
Arch. Biochem. Bioph., 141, 38-52

LUMAC SYSTEMS (1977): Lumit(R), bioluminescense reagents for ATP measurements
Produktinformation, Lumac Systems AG, Basel, Switzerland

LUNDIN, A., RICKARDSSON, A. and THORE, A. (1976): Continous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase
Anal. Biochem.,75, 611-620

MANN, T. (1945a): Studies on the metabolism of semen. 1. General aspects, occurence and distribution of cytochrome, certain enzymes and coenzymes
Biochem. J.,39, 451-458

MANN, T. (1945b): Studies on the metabolism of semen. 2. Glycolysis in spermatozoa
Biochem. J., 39, 458-465

MANN, T. (1945c): Anaerobic metabolism of spermatozoa
Nature, London, 156, 80-81

MANN, T. (1949): Metabolism of semen
Adv. Enzym., 9, 329-390

MANN, T. (1964): The biochemistry of semen and of the male reproductive tract
Methuen & Co.Ltd., London

MASAKI, J. and HARTREE, E.F. (1962): Distribution of metabolic activity,phospholipid and hyaluronidase between the heads and tails of bull spermatozoa
Biochem. J., 84, 347-353

MCELROY, W.D. (1947): The energy source for bioluminescense in an isolated system
Proc. Nat. Acad. Sci, 33, 342-345

MCELROY, W.D., HASTINGS, J.W., COULOMBRE, J. and SONNENFELD, V. (1953): The mechanism of action of pyrophosphate in firefly luminescense
Arch. Biochem. Biophys., 46, 399-416

MEYERHOF, O. and OESPER, P. (1949): The enzymatic equilibria of phosphoenolpyruvate
J. Biol. Chem., 179, 1371-1385

MILLER, W.J. and VANDEMARK, N.L. (1953): The influence of glycerol level, various temperature aspects and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at subzero temperatures
J. Da. Sci., 37, 45-51

NELSON, L., (1954): Adenosintriphosphatase activity of spermatozoa
Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Mass., 107, 301-309

NEVO, A.C. and RIKMENSPOEL, R. (1969): Diffusion of ATP in Sperm flagella
J. theor. Biol., 26, 11-18

NEWTON, A.A. and ROTHSCHILD,LORD, F.R.S. (1961): Energy-rich phosphate compounds in bull semen: comparison of their metabolism with anaerobic heat production and impedance change frequency
Proc. Roy. Soc., B/155, 183-194

PAUFLER, S.K. u. Mitautoren (1974): Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch
Verlag M. & H. Schaper, Hannover

PETERSON, R.N. and FREUND, M. (1970): ATP-synthesis and oxidative metabolism in human spermatozoa
Biol.Rep.,3, 47-54

PFETSCH, J. (1979): Zur ATP-Bestimmung im Sperma einiger Haustierarten mit dem Biolumineszenzverfahren
Vet. Med. Diss., München

PRINZEN, R. (1977): ATP-Bestimmung mit einer Schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien
Zuchthg., 12, 105-108

QUINN, P.J. and WHITE, J.G. (1968): Distribution of adenosintriphosphatase activity in ram and

bull spermatozoa
J. Reprod. Fert., 15 449-452

RASMUSSEN, H.N. (1978): Preparation of partially purified firefly luciferase suitable for coupled assays. Methods in Enzymolgy, ed. DELUCA, M.A., 57, 31-36, Acad. Press, New York, San Francisco, London

ROGERS, B.J. and MORTON, B. (1973): ATP-levels in hamster spermatozoa during capacitation in vitro Biol. Rep., 9, 361-369

ROUSSEL, J.D. and STALLCUP, O.T. (1966): Relationships between phophatase activity and other characteristics in bull semen. J. Reprod. Fert., 12, 423-429

SALISBURY, G.W. and VANDEMARK, N.L. (1961):: Physiology of reproduction and artifical insemination of cattle
W.H. Freeman & Co., San Francisco, London

SAROFF, J. and MIXNER, J.P. (1954): The relationship of egg yolk and glycerol content of dilutes and glycerol equilibrtion time to survival of bull spermatozoa after low temperature freezing, J.Da. Sci. 38, 292-297

SCHIRREN, C., LAUDAHN, G., HEINZE, J. HARTMANN, E. and RICHTER, E. (1979): Correlation studies of morphological and biochemical parameters in human ejaculate in various andrological diagnosis
Andrologia, 11, 393-401

SELIGER, H.H. (1978): Excited states and absolute calibrations in bioluminescense
Methods in Enzymolgy, ed. DELUCA, M.A., 57, 560-600, Acad. Press, New York, San Francisco, London

SELIGER, H.H. and MCELROY, W.D. (1964): The colours of firefly bioluminescense: enzyme configuration and species specificity
Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 75-81

STANLEY, P.E. and WILLIAMS, S.G. (1968): Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphat by the luciferase enzym
Anal. Biochem., 29, 381-392

STEINBACH, J. and FOOTE, R.H. (1964): Post-thaw survival of bovine spermatozoa frozen by different methods in buffered-yolk and skin-

milk extenders
J. Da. Sci., 47, 909-915

STREHLER, B.L. and Totter, J.R. (1952): Firefly luminescense in the study of energy transfer mechanisms
Arch. Biochem. Biophys., 40, 28-41

SWEDES, J.S., SEDO, R.J. and ATKINSON, D.E. (1975): Regulation of growth and protein synthesis to the adenylate energy charge in an adenine requiring mutant of escherichia coli
J. Biol. Chem., 250, 6930-6938

THORE, A. (1979a): Technical aspects of the bioluminescent firefly luciferase assay of ATP
Science Tools 26, 30-34

THORE, A. (1979b): Bioluminescense assay: extraction of ATP from biological specimens
Productinformation LKB Wallac, Turku Finnland

VILAR, O., GIOVENCO, P. and CALAMERA, J.C. (1980): Adneosintriphosphate in human spermatozoa
Andrologia, 12, 225-227

VOGLMAYR, J.K., SCOTT, T.W., SETCHELL, B.P. and WAITES, G.M.H. (1966): Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of

testicular fluid collected from conscious rams
J. Reprod. Fert., 14, 87-99

WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L. and STETTEN, D. (1954): Principles of biochemistry
Mc Graw-Hill Book Co, New York

WHITEHEAD, T.P., KRICKA, J., CARTER, T.J.N. and THORPE, G.H. G. (1979): Analytical luminescense: its potential in the clinical laboratory
Clin. Chem, 25, 1531-1546

Herrn Professor Dr. W. Leidl gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das Interesse an der Arbeit.

Herrn Dr. R. Stolla danke ich für die Durchsicht und Überarbeitung der Dissertation.

Allen Angehörigen der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik möchte ich für die gewährte Hilfe und vielfältige Anregungen danken.

Herrn Professor Dr. W.B. Schill von der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der LMU München danke ich für die Bereitstellung von Probenmaterial.

Lebenslauf:

Am 10. Oktober 1954 wurde ich als Sohn des Tierarztes Dr. Kaspar Kähn und seiner Ehefrau Erika, geb. Baumeister geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit in Weisingen/Kreis Dillingen/Donau, wechselte ich 1964 auf das Gymnasium über. Im Juni 1973 absolvierte ich am neusprachlichen Zweig des Johann-Michael-Sailer-Gymnasiums die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München. Im Frühjahr 1979 legte ich dort das tierärztliche Staatsexamen ab und erlangte im selben Jahr die Approbation als Tierarzt.

Mit der Anfertigung vorliegender Arbeit begann ich im Oktober 1979.

Seit April 1980 bin ich Assistent an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät München.